GE Healthcare
Life Sciences

Biacore

Biacore T200

version 2

Instrument Handbook

日本語取扱説明書
基本操作編

GE imagination at work

71-3415-35

目　次

1. セットアップ 1

1-1. 電源およびソフトウェアの起動 1

1-1-1. 電源の立ち上げ 1

1-1-2. ランニング緩衝液、超純水のセット 2

1-1-3. コントロールソフトウェアの起動 4

1-2. システムの初期化 5

1-2-1. センサーチップの挿入 5

1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化 9

1-2-3. 温度設定 10

1-2-4. 試料のセットと取り出し 11

2. 基本操作 14

2-1. マニュアル測定の実行方法 15

2-1-1. 試料の添加 18

2-1-2. レポートポイントの追加 20

2-1-3. 測定の終了 22

2-2. ファイルの保存 22

2-3. データの印刷 22

3. 固定化 23

3-1. アミンカップリング法 25

3-1-1. リガンド希釈液の pH 選択 27

3-1-2. 基本プロトコールでの固定化 34

3-1-3. 固定化量を調節して固定化 41

4. マニュアル測定による相互作用の条件検討 45

5. 相互作用測定 53

5-1. 反応速度定数・解離定数の算出　マルチサイクル法 54

5-1-1. プログラムの実行 57

5-1-2. カーブフィッティングによる解析 66

5-1-3. 平衡値解析 87

5-2. 反応速度定数・解離定数の算出　シングルサイクル法 93

5-2-1. プログラムの実行 94

5-2-2. カーブフィッティングによる解析 109

6. メソッドによるプログラムの作成 124

6-1. ウィザードで作成保存したプログラムの呼び出し 125

6-2. メソッドの編集 126

6-3. メソッドの実行 147

7. メンテナンス 151

7-1. システムの洗浄 154

7-1-1. Desorb 154

7-1-2. Desorb and Sanitize 155

7-1-3. Empty Buffer Tubing 158

7-1-4. Wash Buffer Tubing 160

7-2. シグナルの校正 162

7-2-1. Normalize 162

7-3. システムチェック 163

8. 実験の終了 166

8-1. スタンバイ状態での放置 166

8-2. 電源の落とし方 166

8-3. センサーチップの保存 167

9. センサーグラムの編集.....169

9-1. ソフトウェアの起動..... 169

9-2. ファイルの呼び出し..... 170

9-3. センサーグラムの編集..... 172

9-3-1. センサーグラムの表示..... 172

9-3-2. センサーグラムの表示の変更..... 174

9-3-3. センサーグラムの添加開始時間、ベースライン合わせ..... 175

9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除..... 176

9-3-5. センサーグラムの差し引き..... 177

9-3-6. センサーグラムのノーマライズ..... 178

9-4. グラフの編集..... 180

9-5. データの移管..... 182

9-6. データの保存..... 184

1. セットアップ

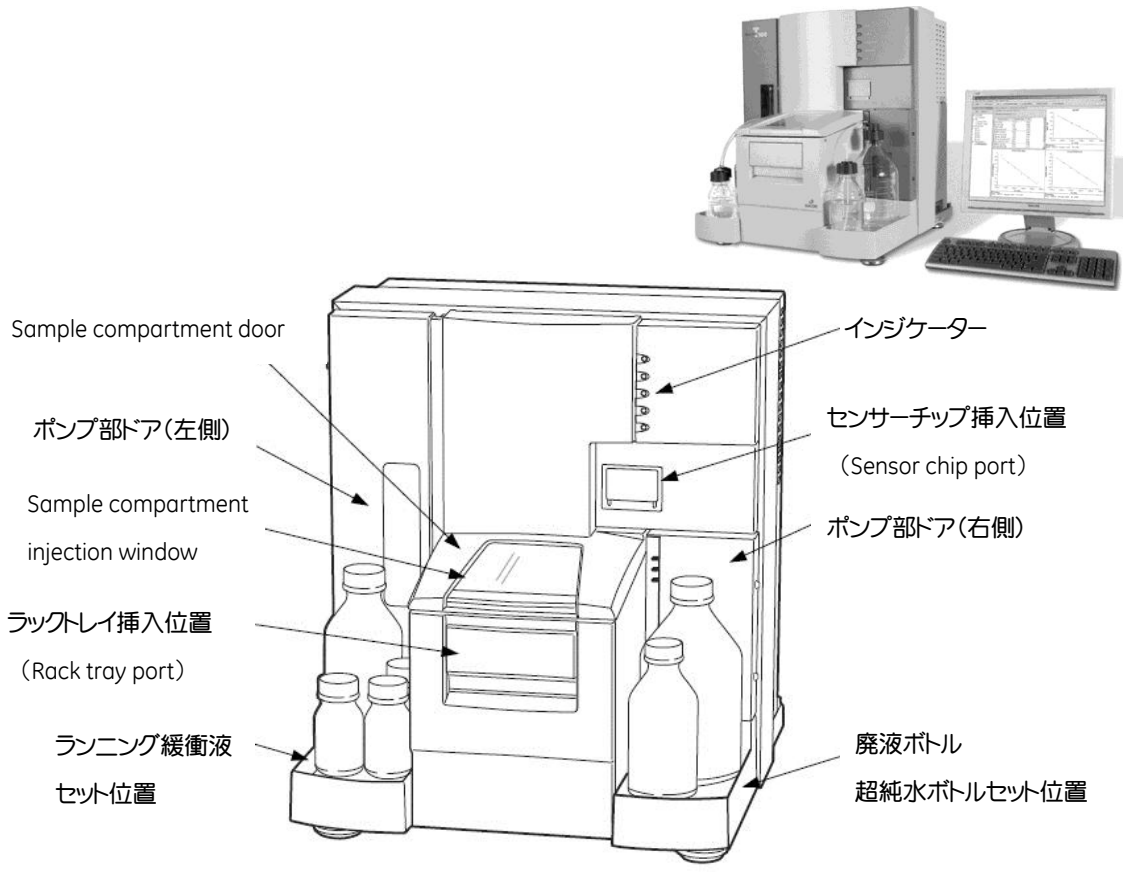
1-1. 電源およびソフトウェアの起動

1-1-1. 電源の立ち上げ

テーブルタップの電源 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピューター の順番に電源を入れます。Windows のバージョンにより、パスワード（biacore）の入力が必要な場合があります。

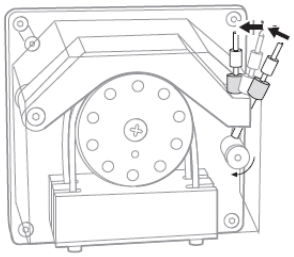
注）装置本体の電源を入れると、本体のフロント右上にあるすべてのインジケーター（LED ランプ）が数秒間点灯し、リセットされて消えます。その後 **ready** のインジケーターが点灯し、**temperature** のインジケーターは点滅します。

補足 1-1. 装置の配置

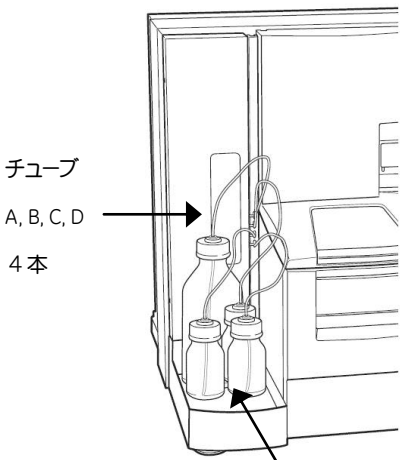


1-1-2. ランニング緩衝液、超純水のセット

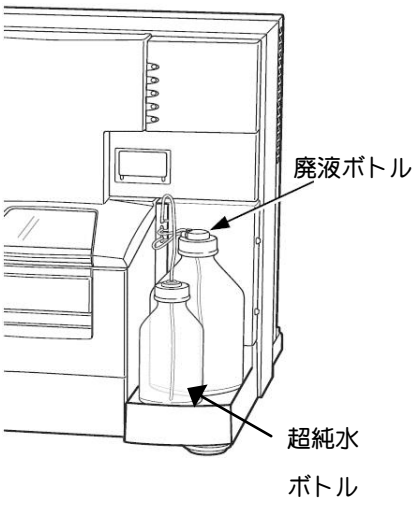
本体に向かって、左側トレイにランニング緩衝液ボトルをセットし、チューブ A を挿入します。廃液ボトル後ろの扉を開けて、ペリスターポンプのロックをします。



右側トレイに、超純水ボトルおよび廃液ボトルをセットして、対応するチューブを挿入します。



左側；ランニング緩衝液ボトル



右側；廃液ボトル・超純水ボトル

補足 1-2. チューブの配置

本体左側

チューブ A,B,C,D には、タグがついているので確認します

チューブ A	ランニング緩衝液ボトルに入れます
チューブ B,C,D	必要に応じて複数のランニング緩衝液をセットできます

本体右側

超純水チューブ	超純水を入れた 500 ml ボトルに入れます
廃液チューブ（2 本）	廃液ボトルキャップに接続します

補足 1-3. ランニング緩衝液の種類

ランニング緩衝液として、弊社から HBS 緩衝液および PBS 緩衝液を販売しています。

HBS-EP+ 10X　（1000 ml, BR-1006-69）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒超純水で 10 倍希釈：0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-P+ 10X　（1000 ml, BR-1006-71）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒超純水で 10 倍希釈：0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.05 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-N 10X　（1000 ml, BR-1006-70）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈：0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4

PBS 10X　（1000 ml, BR-1006-72）

0.1 M phosphate Buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈：0.01 M phosphate Buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, pH7.4

PBS-P+ 10X　（1000 ml, 28995084）

0.1 M phosphate Buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒超純水で 10 倍希釈：

0.01 M phosphate Buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 0.05 % Surfactant P 20, pH7.4

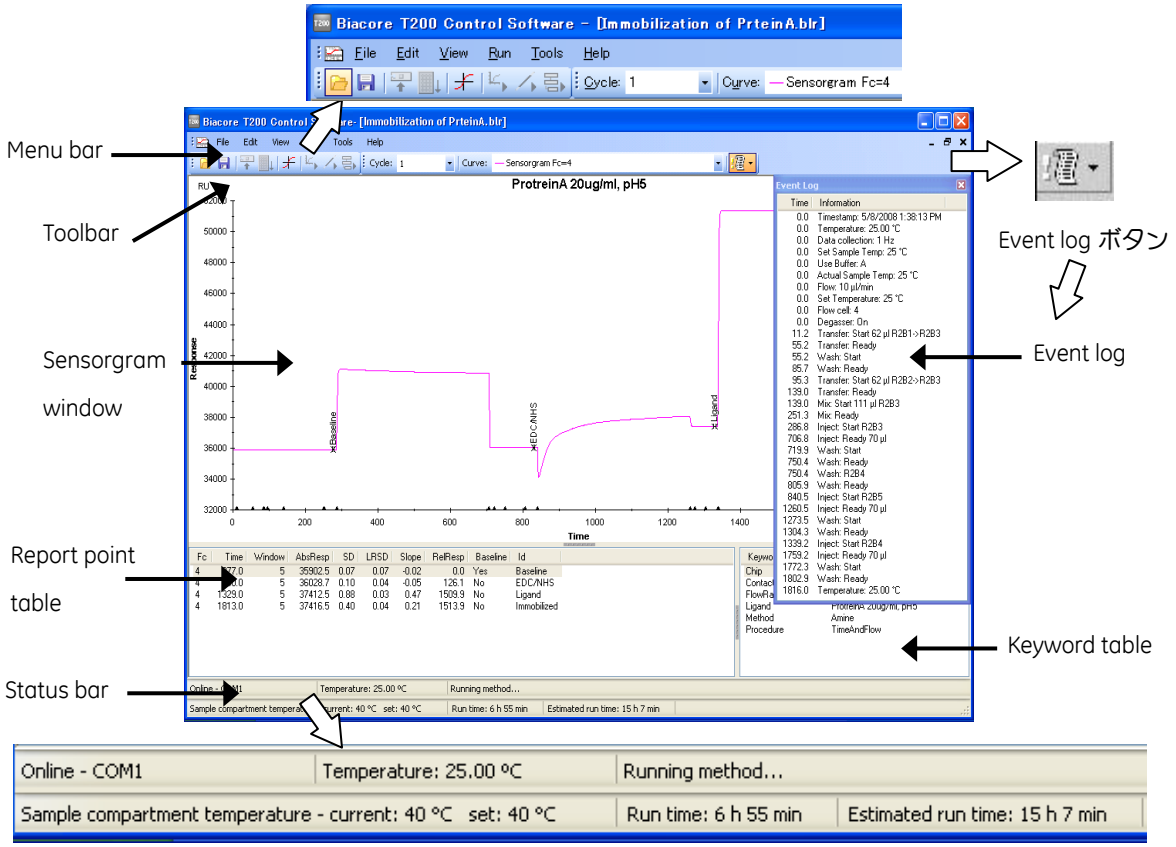
実験目的にあわせて緩衝液を変更してください。

各自で調製する場合には、0.22 µm フィルターでろ過してください。

1-1-3. コントロールソフトウェアの起動

初期画面中の左下の **Start** から、**All programs** → **Biacore** → **Biacore T200 Control Software** のアイコンをクリックします。

補足 1-4. 画面の説明

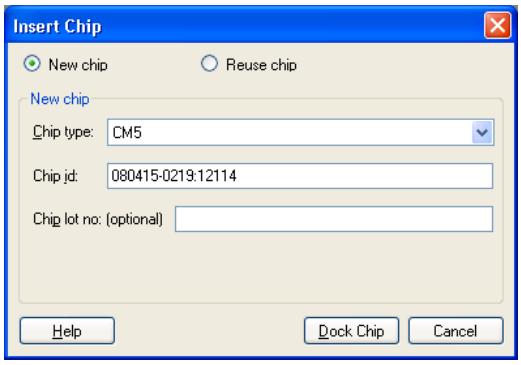


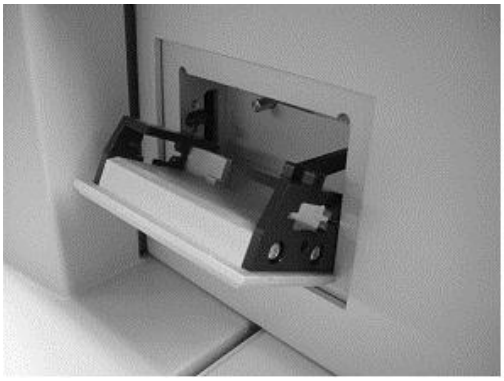
Menu bar	Biacore T200 で実行可能な操作コマンドが含まれます。
Toolbar	使用頻度の高いコマンドをアイコン化、簡便にコマンド操作を選択できます。その時点で実行可能なコマンドが選択可能です。
Sensorgram window	センサーグラムをリアルタイムに表示します。
Report point table	任意時間のレスポンスを数値で表示します。
Event log	測定中の操作内容を表示します。
Status bar	現在のシステムの状態を表示します。 オンライン状況、システム温度（Temperature）、センサーチップのタイプ、サンプル温度（Sample compartment　temperature）、Run 実行状態　など。

1-2. システムの初期化

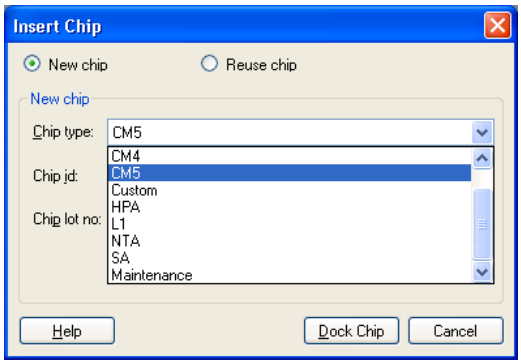
1-2-1. センサーチップの挿入

コントロールソフトウェアを起動すると Insert Chip ダイアログが表示され、同時に Biacore T200 本体右側のセンサーチップポートが自動的に開きます。





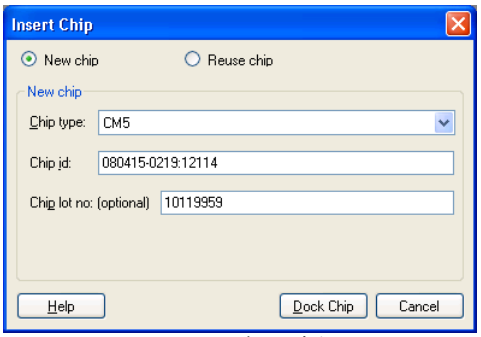
↓



Series S センサーチップ CM5

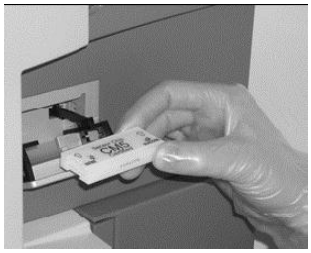
新品のセンサーチップを使用する際は、〇**New Chip** に、再利用のセンサーチップの場合は、〇**Reuse Chip** にチェックを入れ、使用する **Chip type** を選択します。（再利用のセンサーチップを使用する場合は、7 ページを参照してください。）

↓



Chip id は、日付-時間:システムシリアルナンバーが自動入力されます。必要に応じて変更可能です。**Chip lot no （optional）** を入力します。

↓



センサーチップを印字面の両側の矢印の方向でセンサーチップポートに挿入します。センサーチップポートを手で押して閉めます。

Insert Chip ダイアログの **Dock Chip** をクリックします。

↓

Dock が完了して自動的に **Standby flow** 状態になります。

Standby flow とは、セットしたランニング緩衝液（チューブ A）を低流速で流し続けるモードです。最長 7 日間継続します。（バッファー必要量；65 ml/ 24 時間）

補足 1-5. センサーチップ挿入時の注意事項

センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入してください。

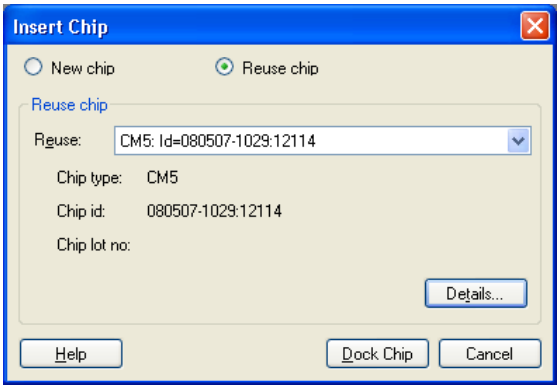
冷蔵庫に保存しているセンサーチップは、室温に戻してから Dock してください。

センサーチップポートを閉じた後、センサーチップを取り出す必要がある場合は、一旦 Insert Chip のダイアログを Cancel します。Toolbar の **Eject** アイコン（ ）を選択して、**Eject Chip** をクリックしてください。

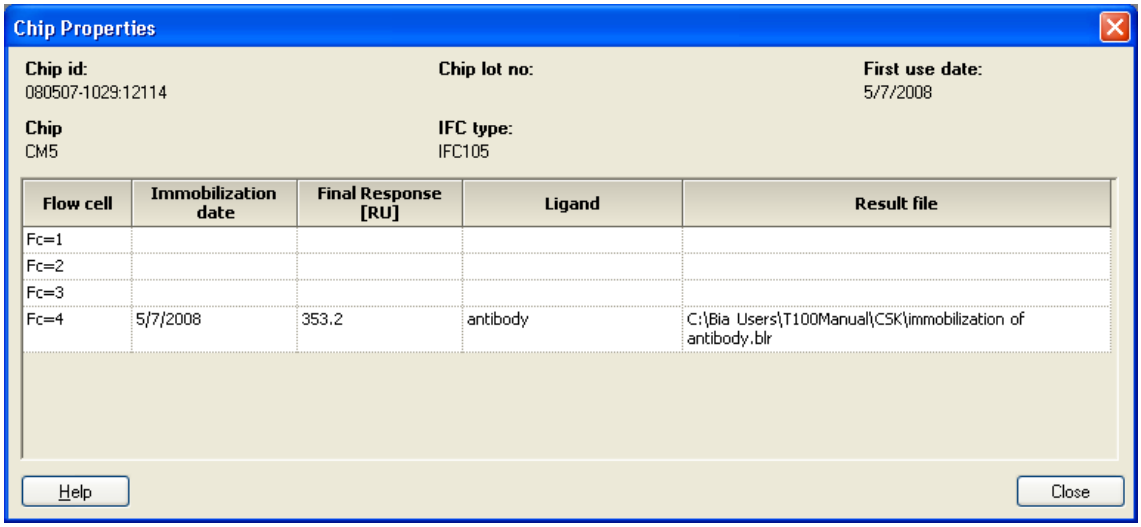
Insert Chip ダイアログを閉じてしまった場合、Toolbar の **Insert** アイコン（ ）を選択すると、再度ダイアログが表示されます。

補足 1-6. センサーチップの固定化履歴

再利用のセンサーチップを使用する場合は、挿入時、〇**Reuse Chip** にチェックを入れると下記のダイアログが表示されます。



Reuse:で、そのセンサーチップに対応した id 番号を選択し、**Details...**をクリックすると、固定化履歴が表示されます。



確認後、**Close** をクリックします。

センサーチップを取り出して保存する場合は、センサーチップカバーに id を書き込むと、次回使用する際に id を選択しやすくなります。

なお、固定化済みセンサーチップを再使用する際に、New chip として Dock すると、前回までの固定化履歴が Chip Properties に登録されず、測定データの解析時に解析ソフトウェアにリガンド情報が反映されません。このため、固定化した表面を再度測定に使用する場合には、Reuse chip で該当するチップ id 番号を選択して Dock してください。

補足 1-7. センサーチップの種類

各センサーチップの詳細は、弊社総合カタログ等を参照してください。

カルボキシル基タイプ（タンパク質、ペプチド、化合物などの固定化）

Series S Sensor Chip CM5	3 枚	BR-1005-30
Series S Sensor Chip CM4	3 枚	BR-1005-34
Series S Sensor Chip CM3	3 枚	BR-1005-36
Series S Sensor Chip C1	3 枚	BR-1005-35
Series S Sensor Chip CM7	1 枚	28-9538-28

ストレプトアビジンタイプ（ビオチン標識の DNA やペプチドなどの固定化）

Series S Sensor Chip SA	3 枚	BR-1005-31
Biotin CAPture Kit, Series S	1 箱	28-9202-34

疎水基タイプ（リン脂質、糖脂質、膜タンパク質などの固定化）

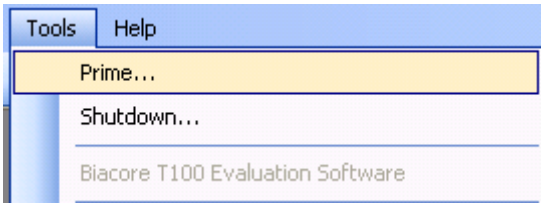
Series S Sensor Chip HPA	3 枚	BR-1005-33
Series S Sensor Chip L1	3 枚	BR-1005-38

金属キレートタイプ（His-tag タンパク質の固定化）

Series S Sensor Chip NTA	3 枚	BR-1005-32

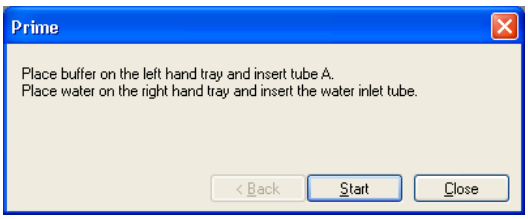
1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化

Menu bar の **Tools** → **Prime** を選択します。



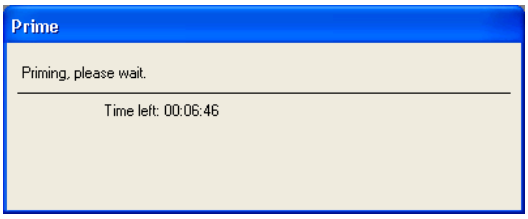
↓

ランニング緩衝液および廃液ボトルを確認後、**Start** をクリックします。

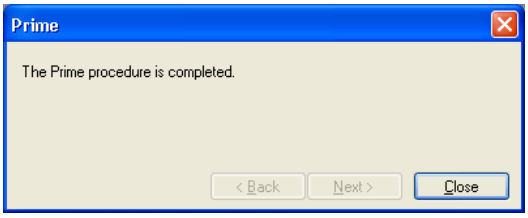


↓

Prime がスタートします。



↓



終了後、**Close** をクリックしてください。
自動的に **Standby flow** 状態になります。

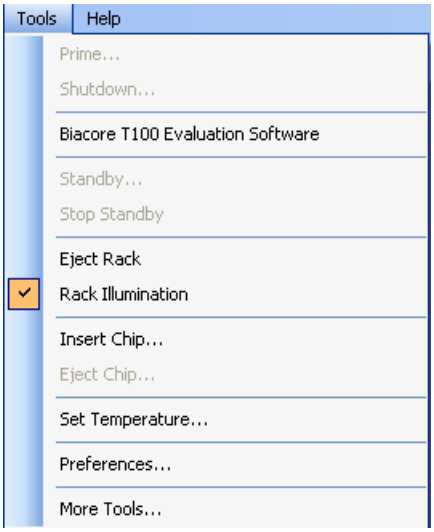
補足 1-8. 実験途中でのランニング緩衝液の交換

Prime は、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラーなどをランニング緩衝液で洗浄・置換する操作です。実験途中でランニング緩衝液を変更する場合も、必ず実行してください。

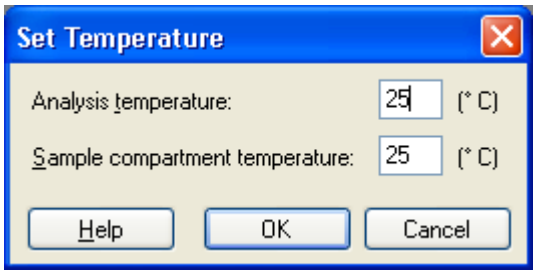
1-2-3. 温度設定

測定温度（Analysis temperature）およびサンプルコンパートメントの温度をそれぞれ設定します。

Menu bar の **Tools** → **Set Temperature...**を選択します。



↓



4～45℃の範囲で設定して、**OK** をクリックします。

（サンプルコンパートメントの温度は室温±15℃以内）

補足 1-9. 設定温度と実際の温度

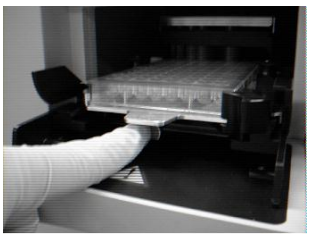
測定は設定温度で安定した後に実施してください。

設定温度に達していない場合は、画面上の Status bar 中の温度表示が赤の点滅、本体インジケーターの temperature ランプが橙色に点滅します。設定温度で安定した場合には、画面上の温度の表示が黒、インジケーターの temperature ランプは点灯に変わります。

温度が完全に安定するには、ある程度時間を要します。測定温度が室温（25℃）と大きく異なる場合は、測定を始める前にあらかじめ設定してください。

1-2-4. 試料のセットと取り出し

すべての試料はラックトレイにセットし、システム内に挿入します。サンプルコンパートメント内に入っているラックトレイを取り出すには、Toolbar の **Eject Rack** アイコン（ ）をクリックします。速やかにシステム本体前面のラックトレイポートが開き、ラックトレイが出てきます。

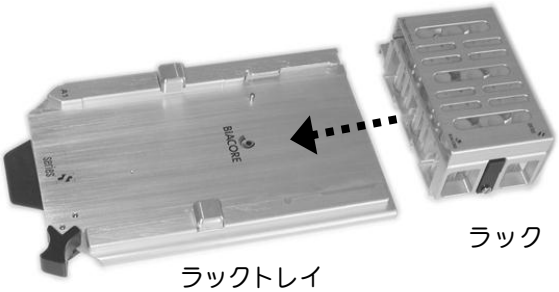


ラックトレイの下に配置した円形のボタンを押すとロックが解除して、ラックトレイを引き出すことが出来ます。

同時に、画面上に **Eject Rack Tray** ダイアログが表示されます。
ラックトレイポートは **60 秒**で自動的に閉まります。
すぐに閉めたい場合は **OK** をクリックしてください。

補足 1-10. ラックトレイ、ラックとバイアルの組み合わせ

バイアルをセットするフォルダをラック、ラックをセットするトレイをラックトレイと呼びます。



ラック

ラックトレイ

各ラックは次のバイアルをセットすることができます。バイアルをセットする際は、必ず専用のラバーキャップを使用してください。パラフィルムなどニードルの穴を塞ぐ可能性のあるシールは、使用しないでください。

Reagent rack, Type 1

1.5 ml プラスチックバイアル（φ11 mm）x 20 本

Reagent rack, Type 2

16 mm ガラスバイアル（4 ml）x 9 本　または、
15 mm プラスチックバイアル（4 ml）x 9 本
7 mm プラスチックバイアル（0.8 ml）x 24 本

Sample and reagent rack（ラックトレイとラックの一体型タイプ）

16 mm ガラスバイアル（4 ml）x 9 本　または、
15 mm プラスチックバイアル（4 ml）x 9 本
1.5 ml プラスチックバイアル（φ11 mm）x 24 本
7 mm プラスチックバイアル（0.8 ml）x 45 本

Rubber caps, type 3 BR-1005-02	Rubber caps, type 2 BR-1004-11		Rubber caps, type 5 BR-1006-55
7 mm Plastic Vials BR-1002-12	1.5 ml Plastic Vials BR-1002-87	16 mm Glass Vials BR-1002-09	15 mm Plastic Vials BR-1006-54

Rack tray

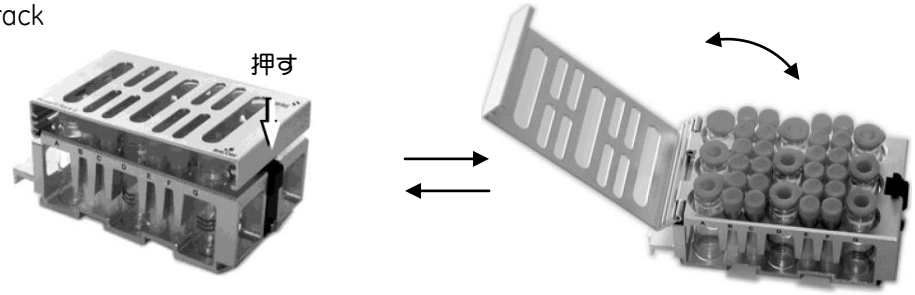
96 well/ 384 well マイクロプレート x 1 枚

Microplate 96-well (BR-1005-03)　**専用シール：**Microplate Foil (96 well) (28-9758-16)

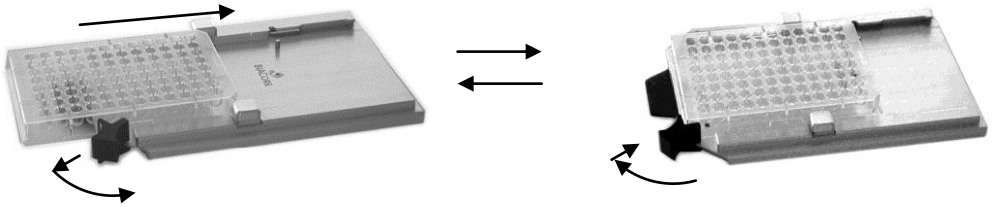
Microplate 384-well (BR-1005-05) **専用シール：**Microplate Foil (384 well) (BR-1005-77)

補足 1-11. ラックトレイへのバイアルおよびプレートのセット方法

Reagent rack

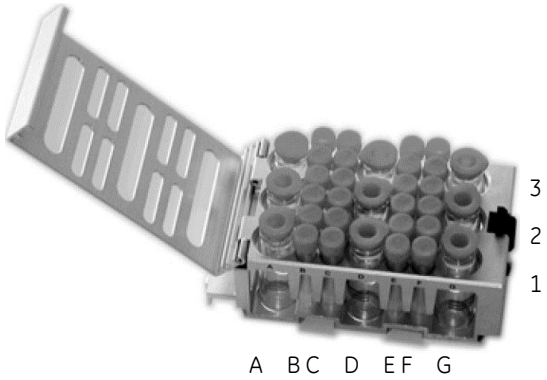


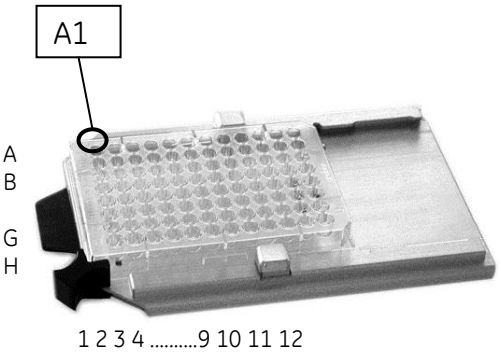
Rack tray



補足 1-12. バイアル位置の指定方法

バイアル位置は、ラックトレイ上の座標で指定します。ラックトレイ前面に刻印されている各列“A B C …”の手前から“1 2 3 …”とカウントします。(例.　左手一番手前は、“A1”。その奥は、“A2”。)





2. 基本操作

測定モードには、以下の 3 つのモードがあります。測定モードを起動する際には、Toolbar の各アイコンをクリックします。

Manual run

画面上のアイコンを使い、測定を行いながら操作するマニュアルモードです。
簡単な試験など、数回の添加で完了する試験を行う場合に有効です。
ただし、測定結果は解析できません。

Application wizards

ガイダンスに従いながら、実験条件を入力して実行させるオートモードです。
リガンド分子の固定化や濃度定量、相互作用解析、サーモダイナミクスなどの実験ごとの専用ウィザードや、pH スカウティングなど実験条件の検討を目的としたウィザードなどの実験項目について対応しています。

Methods

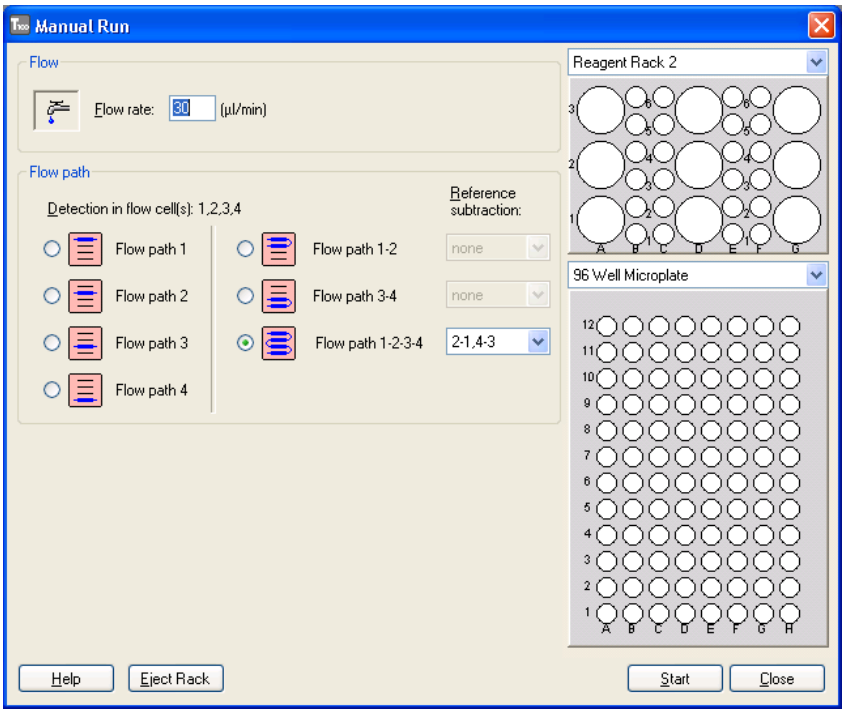
複雑な条件設定や特殊な設定が可能な、汎用性が高いオートモードです。
メソッドビルダー機能によりメソッドを作成します。

ここでは、**Manual run** について説明します。

2-1. マニュアル測定の実行方法

Toolbar の **Start Manual run** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Manual run** をクリックします。

↓

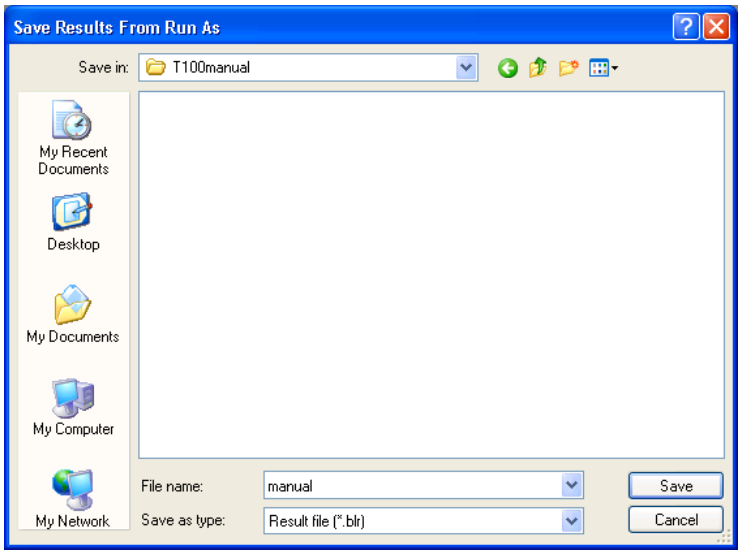


流速（**Flow rate**）を入力します。流速は、1～100 µl/min で設定可能です。
検出モード（**Flow path**）、**Rack** の種類を選択します。ラックがセットされていない場合、**Start** をクリックしてもエラーメッセージが表示され先に進めません。測定開始後にサンプルをセットする場合でも、ラックを挿入してください。
Start をクリックします。

補足 2-1. 試料必要量

試料必要量は、流速（µl/min）と添加時間（s）から計算される試料添加量（µl）に、流路の共洗い分 **28 µl** を加算した量が必要です。平底のバイアルを使用する場合、特殊な添加モードを使用する場合は、必要試料量が異なります。測定開始後にサンプルをセットできるので、添加ダイアログに表示される必要試料量を確認後、試料を調製してセットすると間違いがありません。

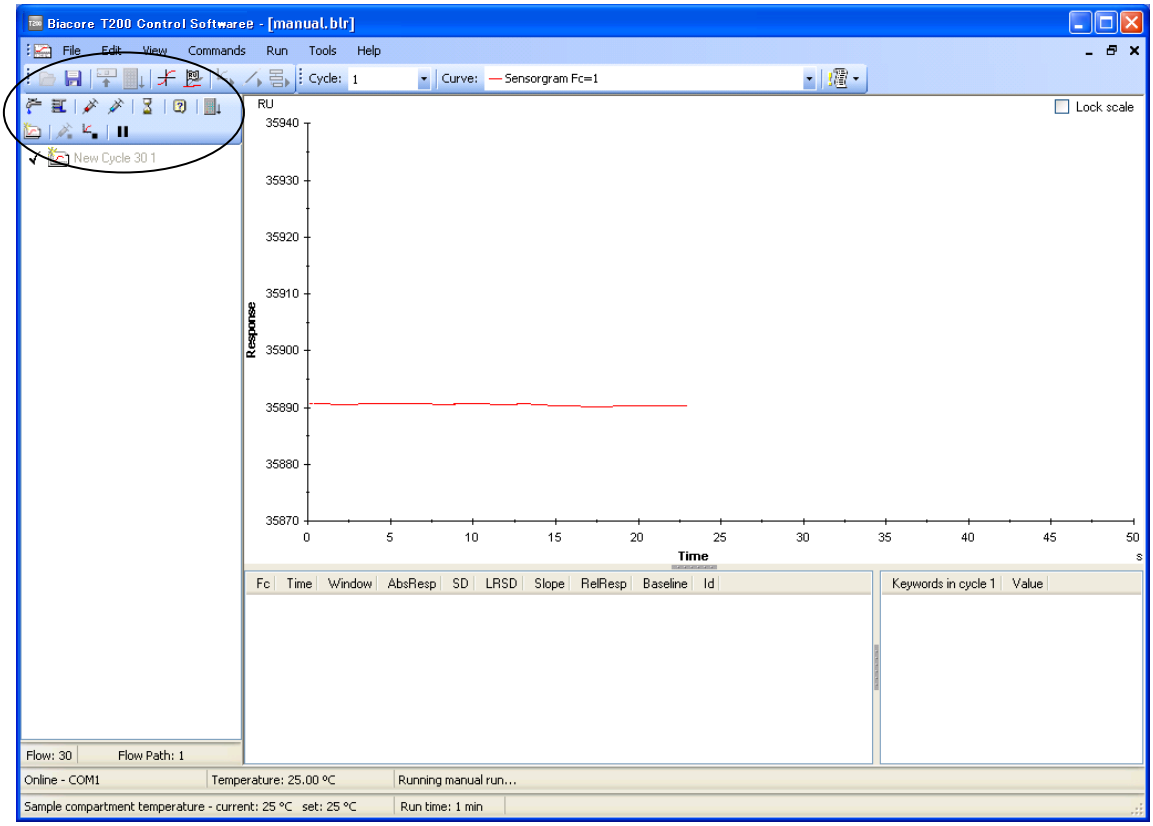
↓



ファイルの保存先を指定します。C:＼Bia Users＼（自分のフォルダ）に移動後、ファイル名を入力して **Save** をクリックします。

↓

センサーグラムが表示され、測定が開始します。



補足 2-2. アイコンの説明

流速の変更

流路の切り替え

赤色　試料の添加、青色　洗浄溶液の添加

待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定）

ラックの取り出し

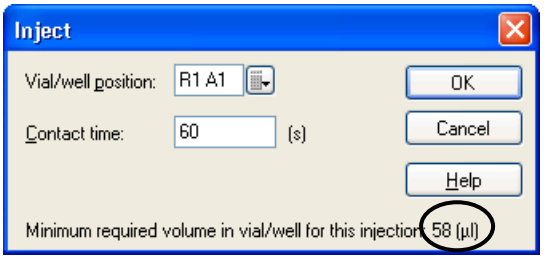
サイクルの切り替え（検出セルの変更も可能）

測定の終了

一時停止

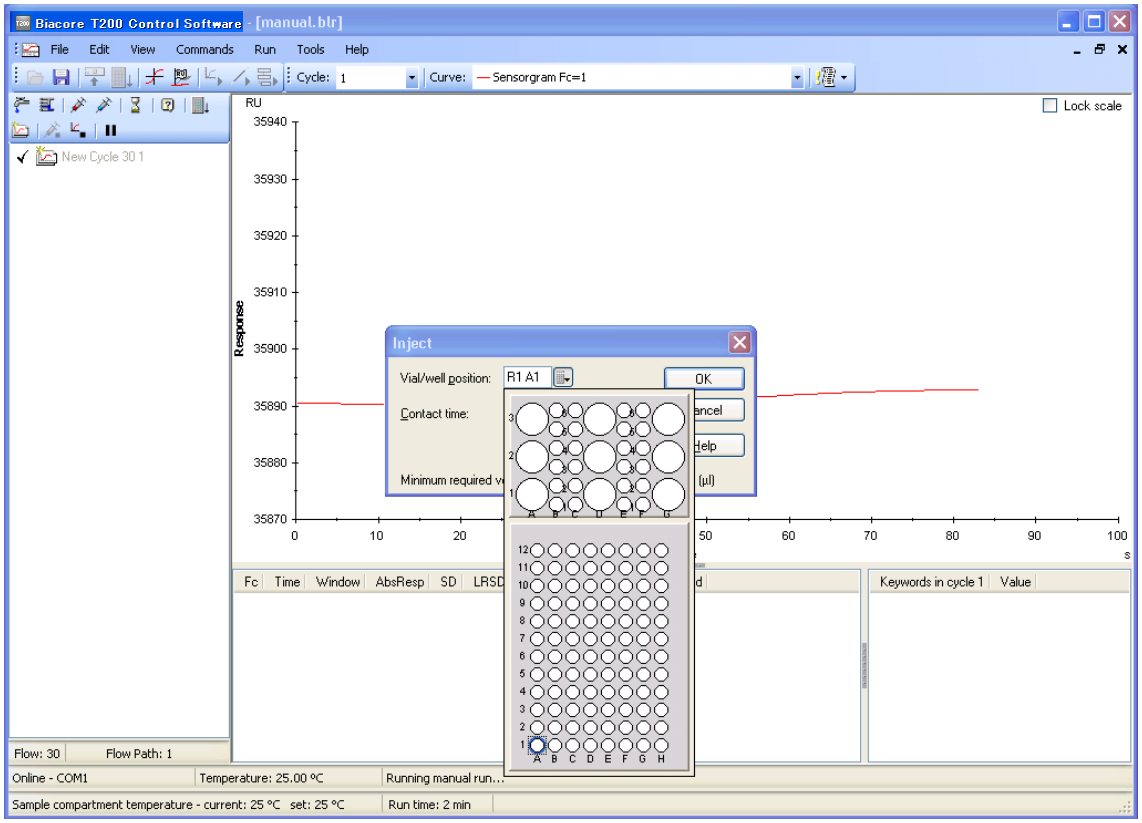
2-1-1. 試料の添加

Inject command アイコン（ ；赤色）または Menu bar の **Commands** → **Inject...**を選択します。



試料の位置（**Vial/well position**）を設定します。この時、試料の位置入力ボックス右のアイコンをクリックすると、ラックの図上で選択できます。
添加時間（**contact time**）を入力します。位置と添加時間を設定すると、**Inject** ダイアログの右下に必要量が表示されます。

↓



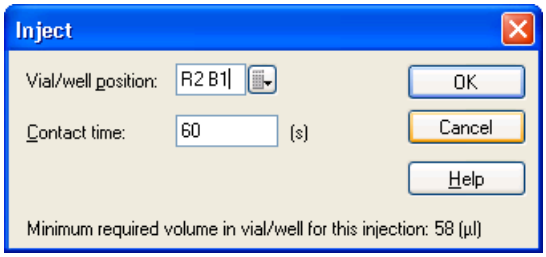
試料をラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除してください。

↓

Eject rack tray アイコン（ ）または **Menu bar** の **Commands→Eject Rack** を選択します。

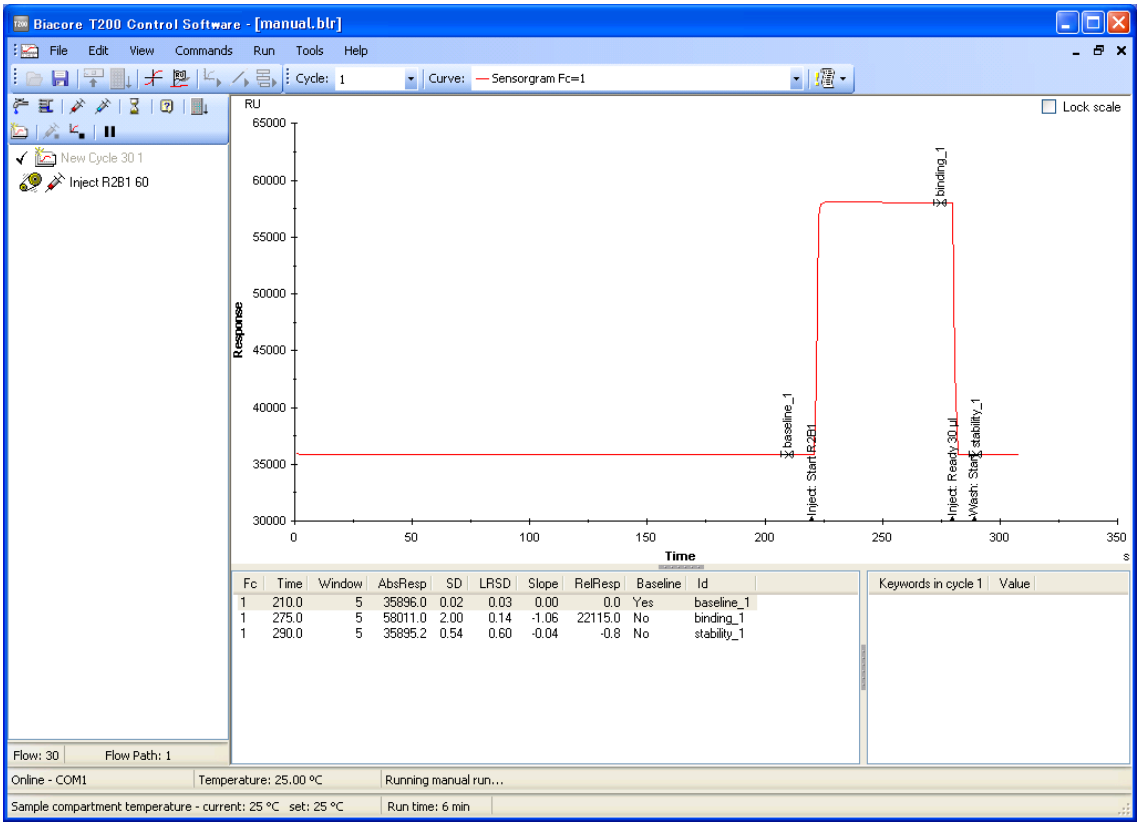
ラックトレイを取り出し、適切な量の試料を分注したバイアルをセットします。ラックトレイを再びシステム本体にセットし **OK** をクリックします。

↓



Inject command アイコンを選択し、試料位置および添加時間を入力します。
OK をクリックします。

↓

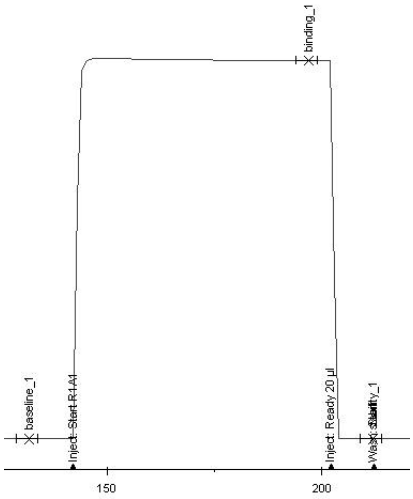

Biacore T200 Control Software - [manual.blr]
File Edit View Commands Run Tools Help
Cycle: 1
Curve: Sensorgram Fc=1
New Cycle 30 1
Inject R2B1 60
RU
Lock scale
Response
Time
binding_1
baseline_1
Inject: Start R2B1
Inject: Ready 30 µl
Wash: Start
stability_1
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
1 210.0 5 35896.0 0.02 0.03 0.00 0.0 Yes baseline_1
1 275.0 5 58011.0 2.00 0.14 -1.06 22115.0 No binding_1
1 290.0 5 35895.2 0.54 0.60 -0.04 -0.8 No stability_1
Keywords in cycle 1 Value
Flow: 30 Flow Path: 1
Online - COM1 Temperature: 25.00 °C Running manual run...
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C Run time: 6 min

必要に応じて引き続き試料を添加します。

2-1-2. レポートポイントの追加

レポートポイントとは、センサーグラムの任意の時間におけるレスポンス（RU）を記録したものです。レポートポイントは、レポートポイントテーブルに表示されます。試料が添加されると、その都度、自動的にレポートポイントが取得されます。自動取得したレポートポイント以外にも、任意の時間に幾つも追加することが可能です。

補足 2-3. 自動取得されるレポートポイント



レポートポイントテーブル

Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
1	132.0	5	36881.6	0.09	0.10	0.00	0.0	Yes	baseline_1
1	197.0	5	59602.6	2.58	0.23	-1.38	22721.0	No	binding_1
1	212.0	5	36879.7	0.16	0.14	-0.05	-1.9	No	stability_1

Id（レポートポイント名）

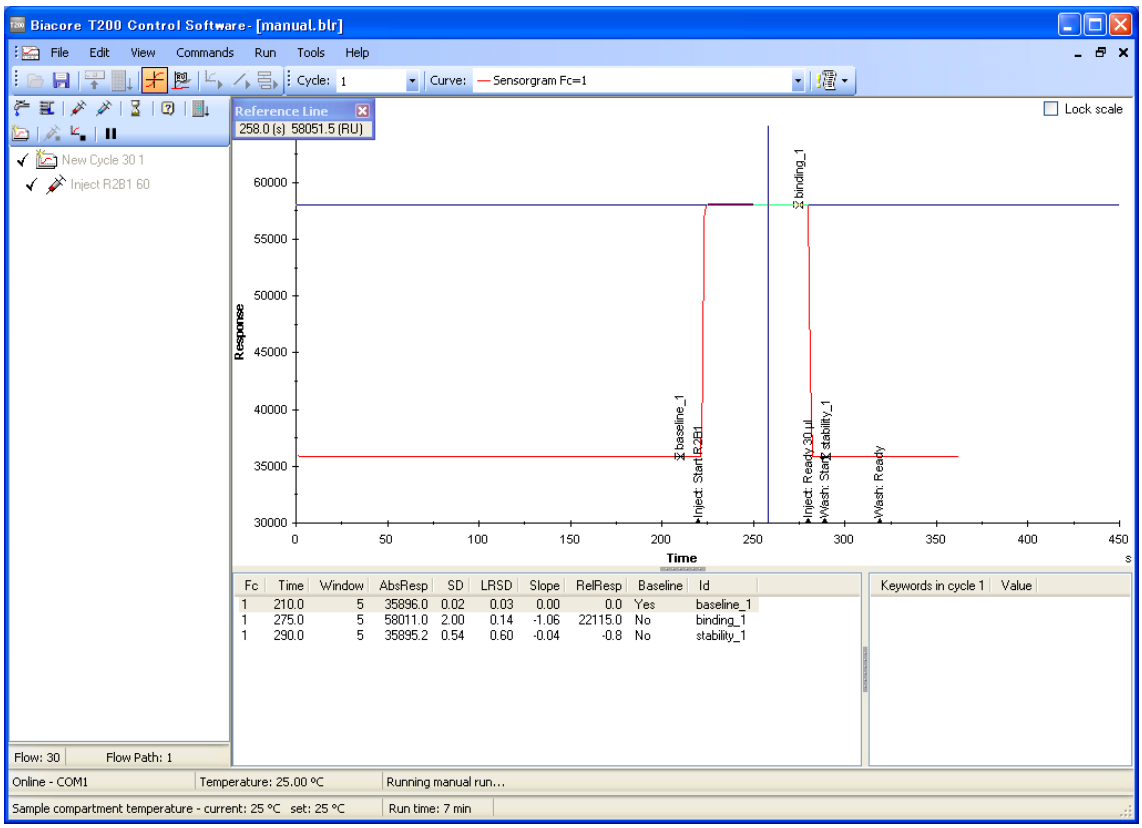
baseline_1	添加開始 10 秒前
binding _1	添加終了 5 秒前
stability _1	添加終了 10 秒後

“baseline_1”のセンサーグラムの高さ（RU）は “0（ゼロ）RU”（RelResp 0.0）に自動設定されます。“binding_1”もしくは“stability_1”の RelResp は、“baseline_1”からの相対値（RU）を示しています。

2 つ目の試料添加時のレポートポイント名は、“baseline_2”“binding_2” “stability_2”となります。RelResp は、“baseline_2”からの相対値（RU）です。

Toolbar の **Reference line** アイコン（ ）または Menu bar の **View** → **Reference Line** をクリックして、センサーグラム上にリファレンスラインを表示します。

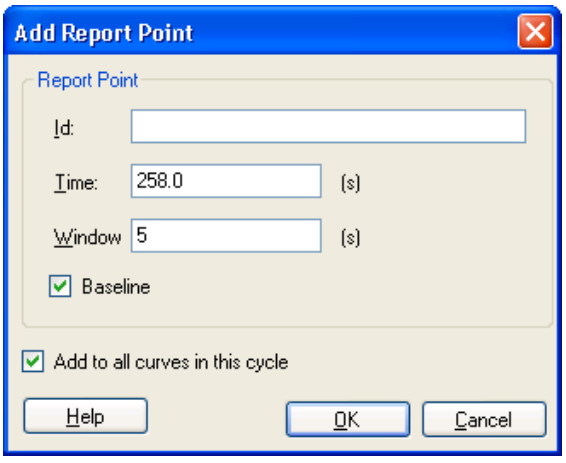
↓



マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線に合わせ、任意の時間までドラッグします。または、任意の時間上のセンサーグラムをクリックし、リファレンスラインを移動させます。

↓

Toolbar の **Add Report point** アイコン（ ）または Menu bar の **Edit** → **Report point** をクリックします。



Id にコメントを入力します。相対値 0（ベースライン）として設定する場合は **Baseline** をチェックします。**OK** をクリックすると、レポートポイントが追加されます。

2-1-3. 測定の終了

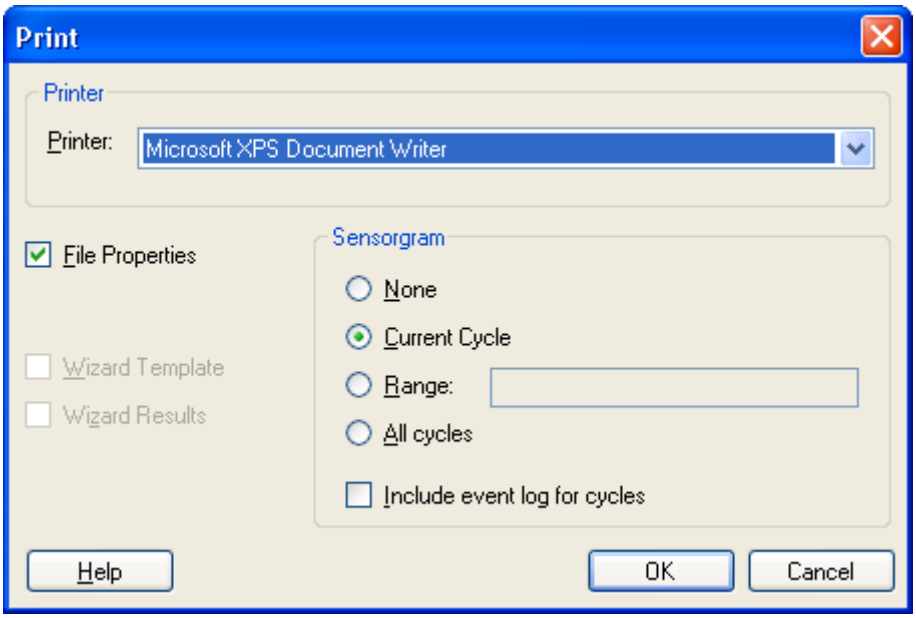
試料添加終了後、**End Manual run** アイコン（ ）または **Menu bar** の **Commands** → **End Run** をクリックします。装置は自動的に **Standby flow** 状態になります。

2-2. ファイルの保存

得られたセンサーグラムは、測定終了時に自動保存されます。
追加したレポートポイントを保存するには、Menu bar の **File** → **Save** をクリックします。

2-3. データの印刷

File → **Print…**をクリックします。印刷したい項目にチェックを入れ、**OK** をクリックします。



File Properties	ファイルプロパティ
Wizard Template または Method	測定内容
Wizard Results または Sensorgram	測定結果
	Current Cycle・・・表示されているセンサーグラム
	Range・・・複数サイクル存在する場合の必要な部分のセンサーグラム
	All cycles・・・すべてのセンサーグラムの印刷
Include event log for cycles	イベントログ

3. 固定化

リガンド

相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子を**リガンド**と言います。リガンドの精製度は、結合特異性の判定やアナライトの結合許容量に大きく影響します。直接固定化を行う場合には、90%以上の精製度のリガンドを使用してください。

各種固定化方法

センサーチップ CM5 に、化学結合で固定化する代表的な方法を記載します。詳細およびその他の固定化方法については、“生体分子相互作用解析 攻略ガイド”を参照してください。

アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジン ε -アミノ基）を利用して固定化する方法です。CM（カルボキシメチル）デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、リガンドを固定化します。固定化後、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングします。

リガンドチオールカップリング法

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて、-S-S-結合で固定化する方法です。

サーフェスチオールカップリング法

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して-S-S-結合で固定化する方法です。

アルデヒドカップリング法

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の糖を利用して固定化をする方法です。糖鎖の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により開裂させ、アルデヒド基を作成して、ヒドラジンにより、ヒドラジノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化します。

固定化量

実験の目的によって調節する必要があります。

特異的結合の有無の判定、スクリーニング

アナライトの結合レスポンスが十分得られる固定化量が必要となります。固定化量の下限として、理論的最大結合量 R_{max}（固定化したリガンドにアナライトが最大量結合したときのレスポンス）が、最低でも **20 RU** は必要です。理論的な最大結合量は、以下の式で算出できます。

アナライトの最大結合レスポンス（理論的最大結合量 R_{max}）
=アナライトの分子量 x リガンドの固定化量/リガンドの分子量 x S
（Da）　（RU）　（Da）
S はリガンドのアナライト結合部位数

（例）

リガンドの分子量	50,000 Da
リガンド固定化量	1,000 RU
リガンド結合部位数	1
アナライト分子量	20,000 Da
理論的最大結合量（R_{max}）	= 20,000 x 1,000 / 50,000 x 1 = 400 RU

濃度測定

固定化量はできるだけ多くします。目安として、タンパク質リガンドの場合、10,000 RU 以上固定化します。固定化量を多くすると、既知濃度アナライト測定時に得られる結合レスポンス RU vs C（濃度）をプロットした検量線の直線性が高くなります。

反応速度定数（k_a,k_d）、解離定数（K_D）の算出

固定化量はできるだけ抑えます。マストランスポートリミテーション（固定化量が多いことにより、アナライトの供給が追いつかない現象）を抑制するためです。至適固定化量は、以下の式から算出される最大と最小の固定化量（RU）の範囲となります。

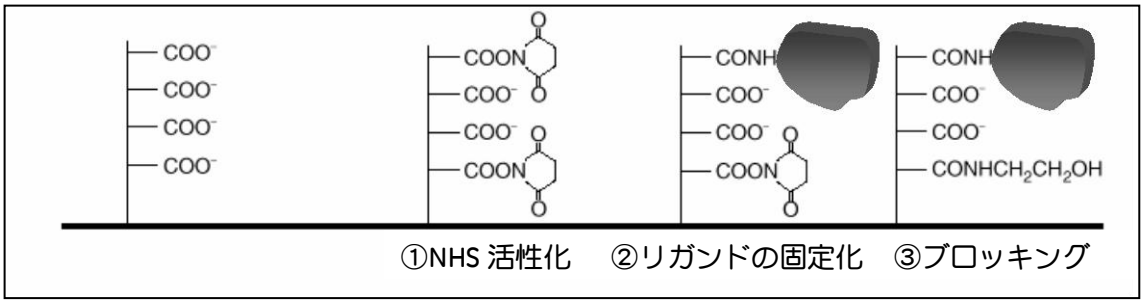
最小固定化量（RU）
40 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
最大固定化量（RU）
200 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
S はリガンドのアナライト結合部位数

（例）

リガンドの分子量	50 kDa
アナライトの分子量	100 kDa
リガンド結合価数	1
最小固定化量	40 x 1/1 x（50,000/100,000） ＝ 20 RU
最大固定化量	200 x 1/1 x（50,000/100,000） ＝ 100 RU
至適固定化量範囲	20～100 RU

3-1. アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジン ε -アミノ基）を利用して固定化します。CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、至適な緩衝液で希釈したリガンドを添加して固定化します。残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングします。



①NHS 活性化　②リガンドの固定化　③ブロッキング

準備するもの

アミンカップリングキット（BR-1000-50）

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれています。

EDC （N-ethyl-N'-（3-dimethylaminopropyl）carbodiimide hydrochloride）

NHS （N-hydroxysuccinimide）

1 M ethanolamine hydrochloride 溶液 （pH 8.5）

キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の超純水に溶解し、400 mM EDC、100 mM NHS を調製します。ただちに 200 µl ずつを 7 mm プラスチックバイアルにそれぞれ分注し、ラバーキャップをして使用直前まで -20 ℃で冷凍保存してください。（使用期限：2 か月）使用直前に 1 組ずつの試薬を取り出して、融解して使用します。融解後、試薬の再凍結はできません。エタノールアミンは、溶液で供給されるので冷蔵（4℃）保存します。200 µl ずつ小分けしておくか、使用する直前に分注します。

ランニング緩衝液

1 級アミンを含まない緩衝液を準備してください。

（トリスやグリシン緩衝液は、1 級アミンの緩衝液です。）

リガンド

アジ化ナトリウムなどの求核性物質を含まないものを準備してください。リガンドの安定化目的のために添加されている BSA（ウシ血清アルブミン）、ゼラチンなどのタンパク質類は、あらかじめ除去するか含まれないものを準備してください。

リガンド希釈液

10 mM 酢酸緩衝液、10 mM HEPES 緩衝液、10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）

リガンドの調製

リガンドがタンパク質の場合

リガンドの等電点より 0.5～2 低い pH の緩衝液を用いて、終濃度 5～200 µg/ml 程度になるよう、リガンドを希釈します。等電点が中性付近であれば、希釈用緩衝液として、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0 ～ 5.5）を用います。pH 3.5 以下のものは使用しないでください。等電点が塩基性であれば、希釈用緩衝液として、10 mM HEPES 緩衝液（pH 6.0 ～ 8.0）を用います。

等電点が不明な場合も既知の場合も、固定化前に、あらかじめ、27 ページに示したウィザードの Immobilization pH Scouting により至適なリガンド希釈液の pH を検討します。

濃縮効果が確認できない酸性タンパク質の場合は、サーフェスチオールカップリングもしくはリガンドをビオチン化後、センサーチップ SA に固定化する方法を検討します。

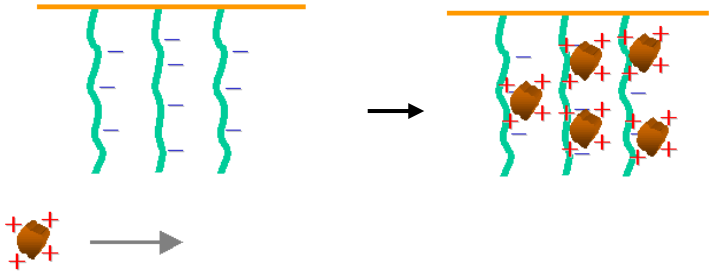
リガンドがペプチドや低分子物質の場合

100 µg/ml 以上の高濃度のリガンドを使用し、弱アルカリ性条件 10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）で希釈します。活性型 NHS 基とアミノ基との反応効率が、pH 8.5 前後でもっとも高いためです。

溶解性が低い低分子化合物を固定化する際には、DMSO などの有機溶媒存在下で固定化を実施します。有機溶媒を利用する際には、化学耐性を英語版マニュアル（Instrument handbook）で確認してください。

3-1-1. リガンド希釈液の pH 選択

センサーチップ CM5 表面にコーティングされている直鎖デキストランにはカルボキシル基が導入されているため、表面は負に荷電しています。リガンドを正に荷電した状態で添加すると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な結合が生じ、リガンドを CM デキストラン中に濃縮させることができます。この濃縮効果のことを、プレコンセントレーション効果といいます。この条件を用いることで低濃度のリガンドをセンサーチップ表面に高濃度で供給でき、効率よく固定化することができます。



等電点が既知のリガンドの場合

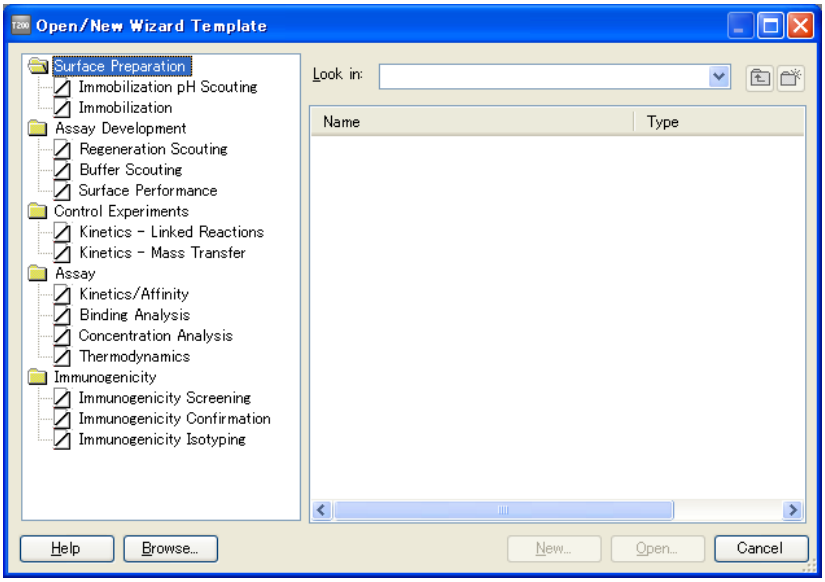
等電点よりも 0.5 以上低い pH を使用する。ただし、等電点が既知の場合であっても、高次構造の状態などにより、濃縮される pH が予想外に異なることもあるため、固定化前に、ウィザードの **Immobilization pH Scouting** により確認することをお奨めします。

等電点が不明な場合

ウィザードの **Immobilization pH Scouting** を実行し、希釈液の pH を検討します。この操作は、何も処理していないフローセル（固定化実施予定のセル）を使用して、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮度合いを評価します。この検討で、リガンドは固定化されません。検討後、引き続き、そのセルにリガンドを固定化してください。

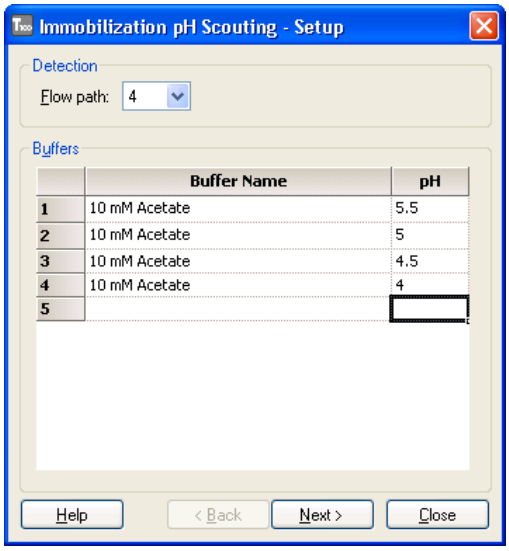
リガンド添加終了後、ランニング緩衝液に置換されると、通常は静電的に結合したリガンドはセンサーチップ表面から速やかに解離します。しかし、まれにリガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすため、**Immobilization pH Scouting** では、リガンド添加終了後、洗浄溶液（50 mM NaOH）を添加し、吸着したリガンドを洗浄する操作が組み込まれています。

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックします。



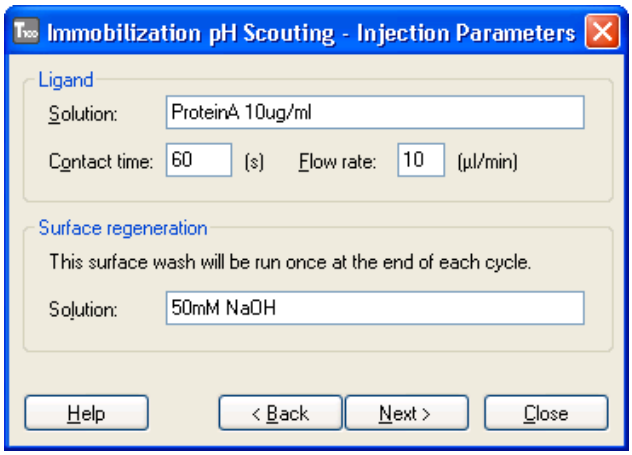
Surface Preparation → **Immobilization pH Scouting** を選択し、**New...**をクリックします。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックします。

↓



Flow path を選択します。固定化予定セルを選択し（偶数セルを選択）、リガンド希釈液を入力します。（デフォルトの変更も可能です。）
Next > をクリックします。

↓



Ligand

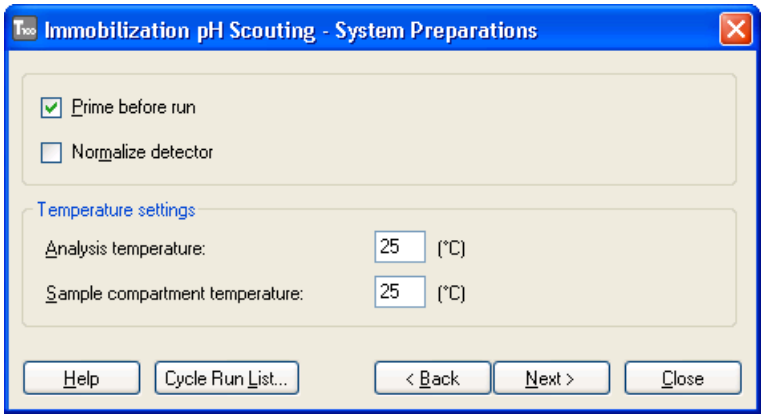
Solution	リガンドの名称	
contact time	添加時間（s）	通常は 60 s に変更
Flow rate	流速（µl/min）	10µl/min

Surface regeneration

Solution	リガンド添加終了後のチップ表面の洗浄溶液（50 mM NaOH）	

各項目に情報を入力後、**Next >**をクリックします。

↓



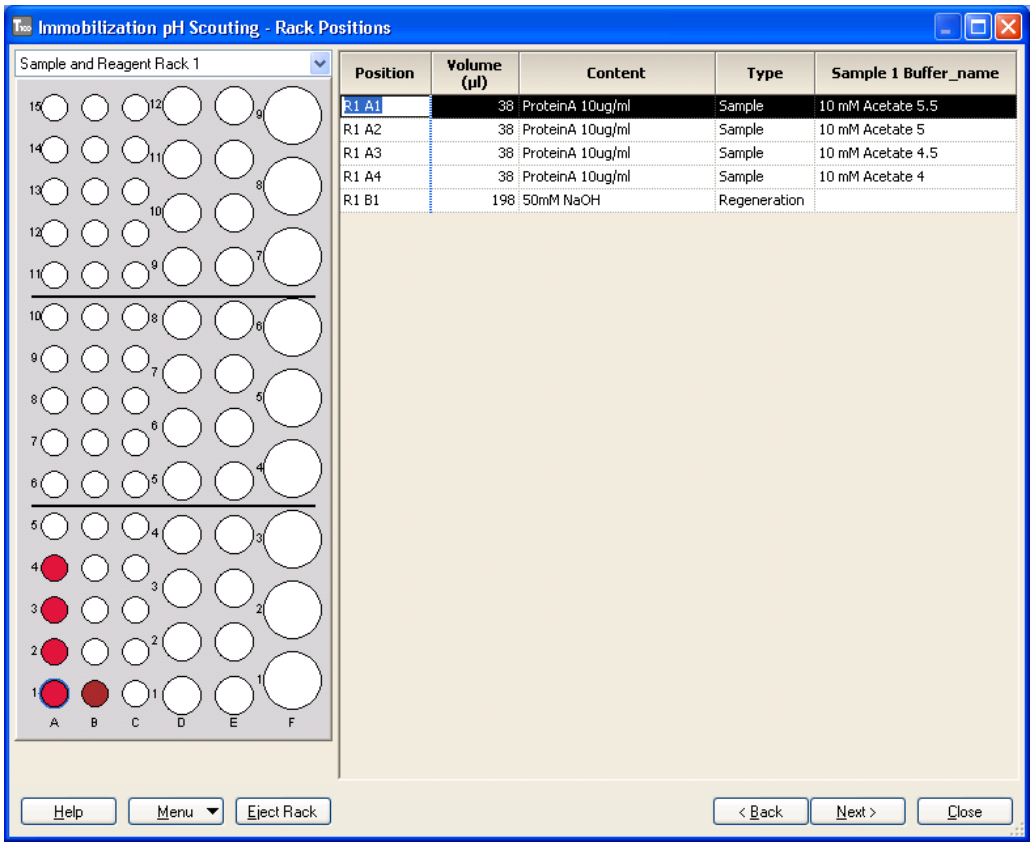
固定化操作を始める前に、**Prime** および **Normalize** の設定が可能です。

Temperature settings

Analysis temperature	25℃
Sample compartment temperature	25℃

入力後、**Next>**をクリックします。

↓



右側の表で試薬の位置と必要量（µl）を確認します。表をクリックすると、対応する左側のラック上のバイアル位置が強調表示になります。位置と必要量（µl）を確認しながら、調製したリガンド、試薬バイアルをラックにセットします。

↓

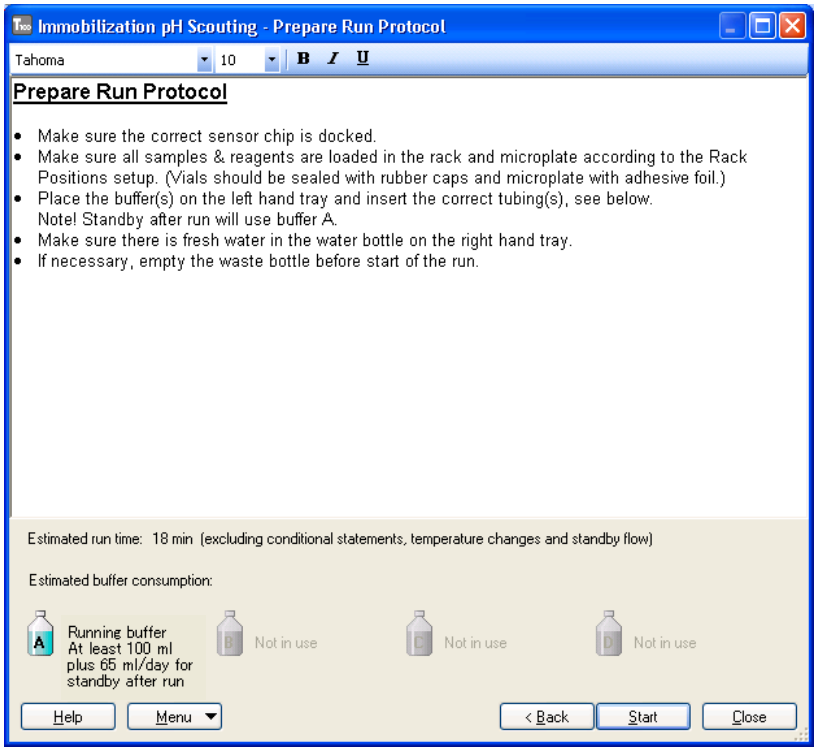
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックします。

↓

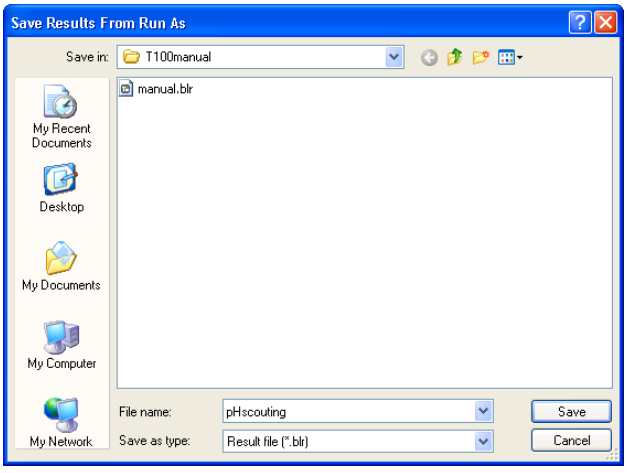


基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液の量が表示されます。
Start をクリックします。

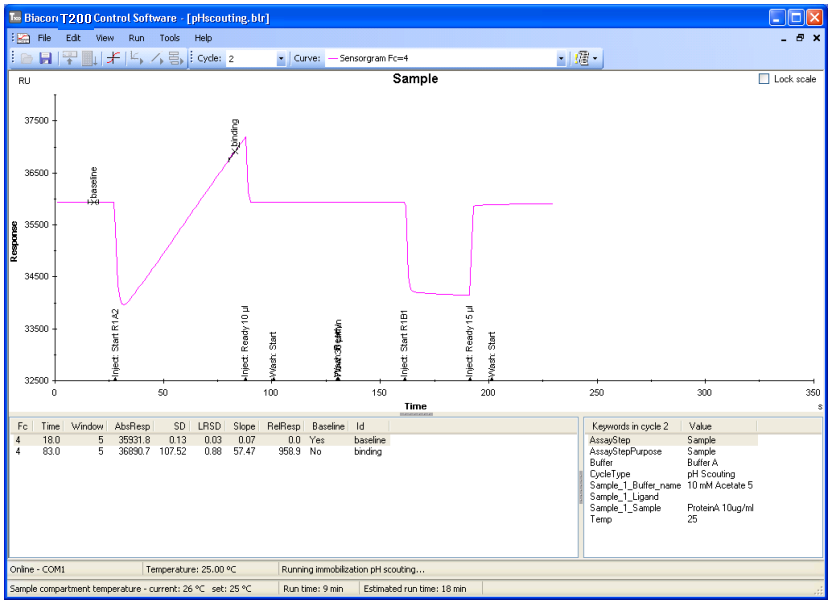
↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

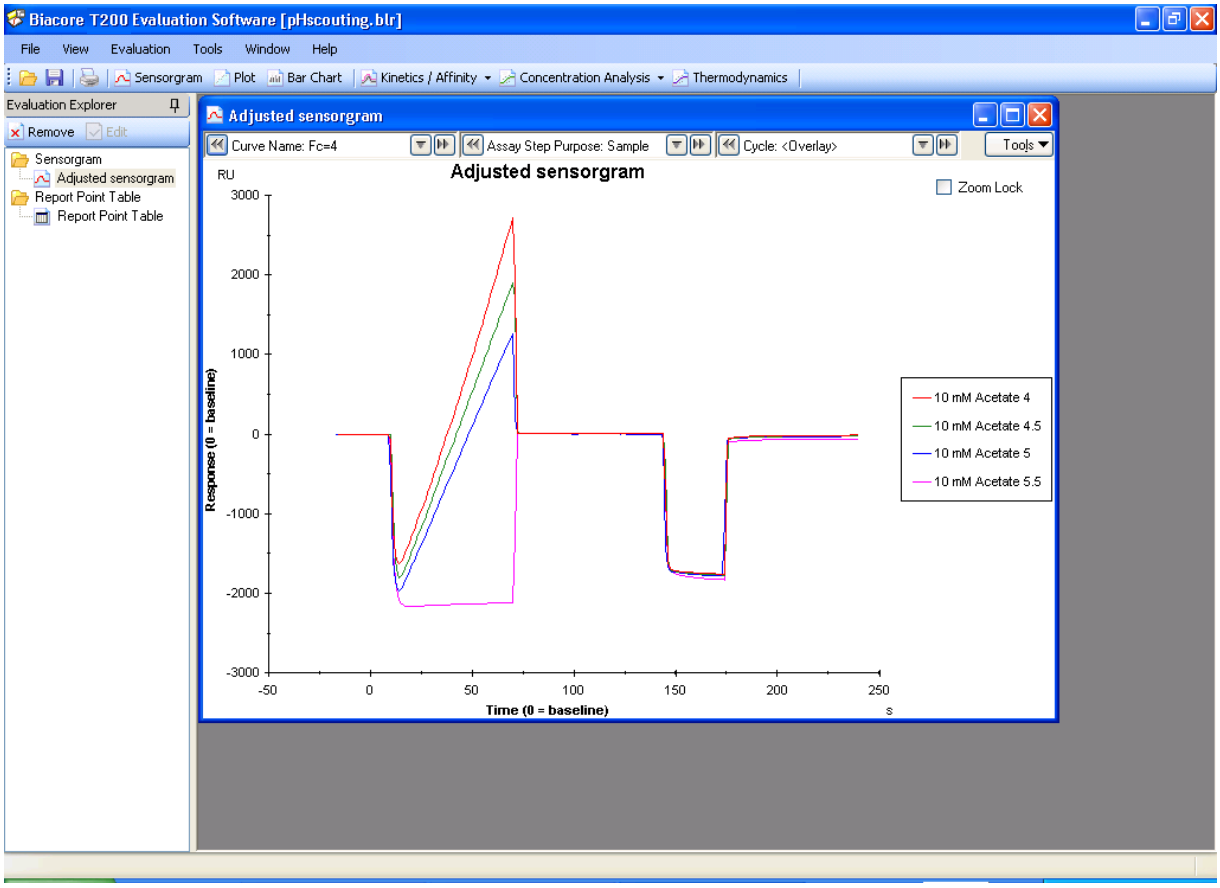


Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** をクリックすると、測定が開始します。

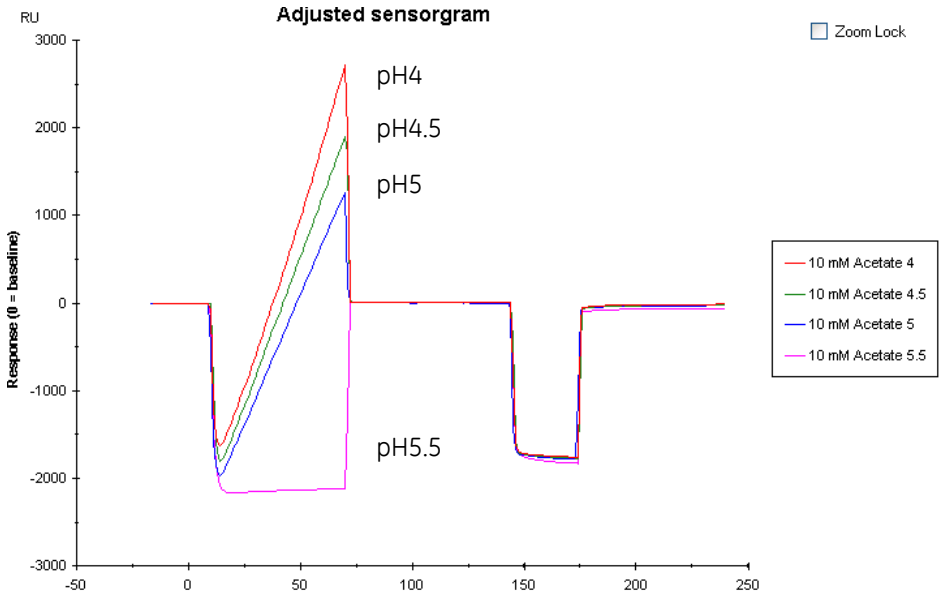


Immobilization pH Scouting 終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各 pH の測定結果が重ね書き表示されます。（Control Software 上の測定データは、入力したファイル名で自動保存されています。）

↓



補足 3-1. Immobilization pH Scouting の評価



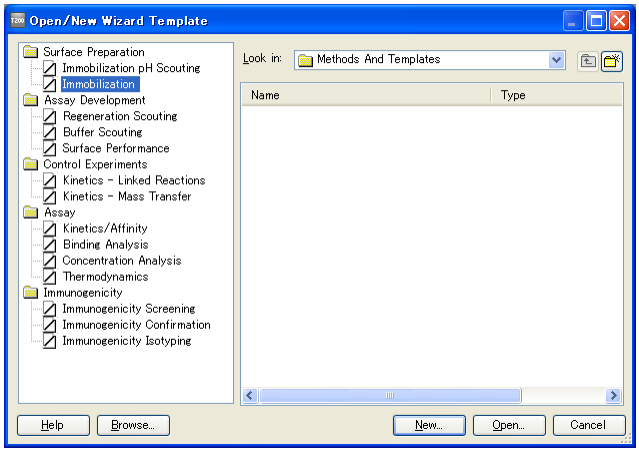
濃縮効果が確認できる、もっとも高い pH を固定化条件として採用します。

上記結果では、pH4 がもっとも濃縮効果が高いが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は低下します（活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5 です）。また、タンパク質の安定性は、一般的に中性に近い程安定です。pH を変化させても、濃縮効果（添加時の傾き）に極端な差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましいです。上記結果では、pH5 を選択します。

なお、Immobilization pH Scouting における濃縮レベル以上の固定化は困難です。確認した濃縮レベル（RU）よりもっと多くの固定化量を望む場合は、リガンド濃度を上げて（例 100 µg/ml 等）、再度 Immobilization pH Scouting を実施し濃縮レベルを確認してください。

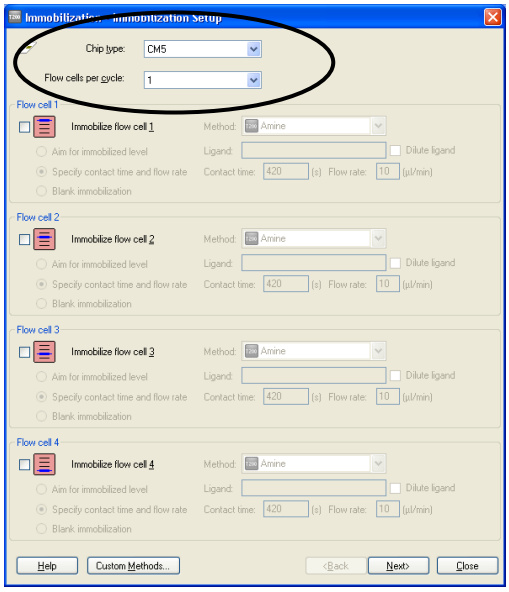
3-1-2. 基本プロトコールでの固定化

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックします。

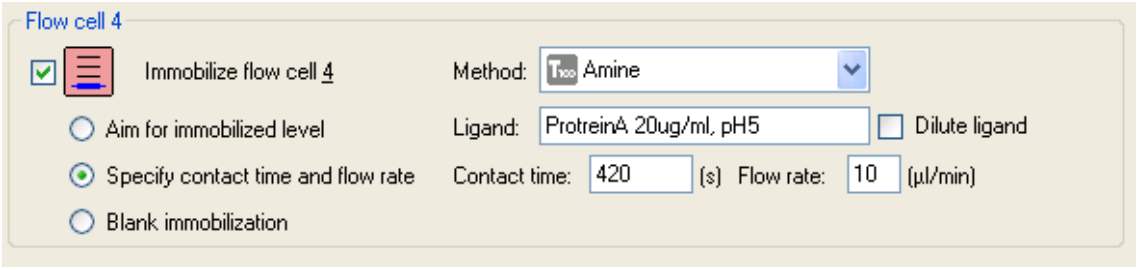


Surface Preparation → **Immobilization** を選択した後、**New...**をクリックします。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックします。

↓



Chip type のプルダウンメニューで、使用するセンサーチップ（**CM5**）を選択します。
Flow cells per cycle で、一度に固定化するセルの数を選択します。通常、1 を選択します。キャプチャー法を使用する場合で、キャプチャー分子を複数セルに固定化する場合には、2 または 4 を選択します。



固定化する **Flow cell** にチェックを入れます。固定化は、偶数セルを選択するのが望ましいです。（通常、リファレンスセルとして Fc1 または Fc3 を使用します。）

Method　　固定化方法を選択します。（ここでは **Amine** を選択します。）

Ligand　　リガンドの名称を入力します。

標準プロトコールでは、NHS 活性化とブロッキングは流速 10 µl/min、添加 7 分間と固定されています。リガンドの添加条件については、以下の項目から選択します。

Aim for immobilized level

リガンドの固定化量を調節して固定化できます。

Specify contact time and flow rate

リガンドの添加時間と流速を指定して固定化できます。

Blank Immobilization

リガンドは添加しません。NHS 活性化後エタノールアミンでブロッキングしたリファレンスセルを作成できます。

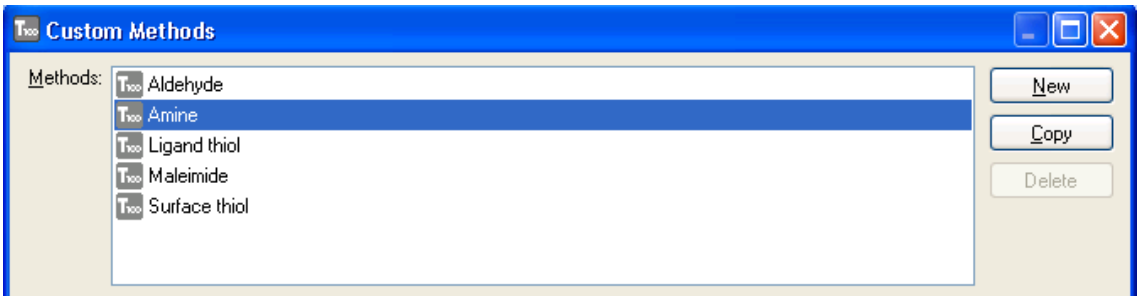
ここでは、Specify contact time and flow rate を選択し、標準的な条件、添加時間 420（s）、流速 10（µl/min）を入力します。**Next >**をクリックします。

↓

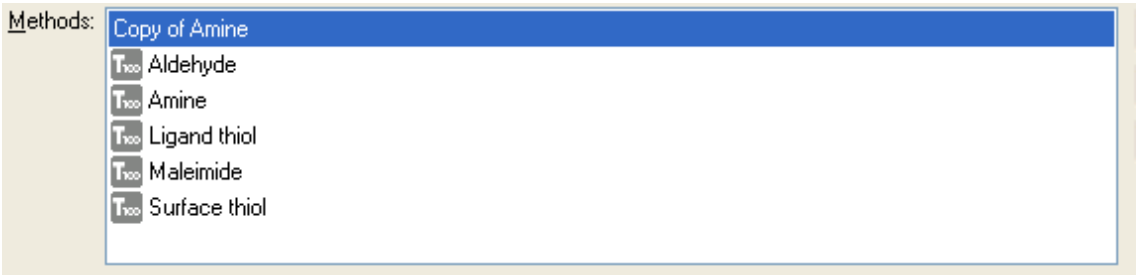
補足 3-2. 標準プロトコールの変更

Specify contact time and flow rate は、活性化時間およびブロッキング時間は 7 分間と指定されています。固定化量を多くする目的で、添加時間を長くしたいなど、既存のメソッドを変更する場合は、画面左下の **Custom Methods...**をクリックします。

画面上部に既存のメソッドが表示されている。**Amine** をクリックし、ハイライトにします。

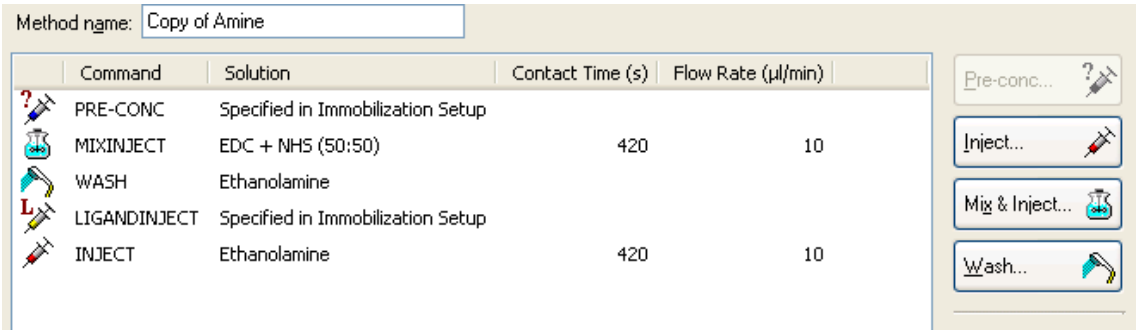


画面右上の **Copy** をクリックします。



Methods:に、コピーしたメソッドが追加されます。

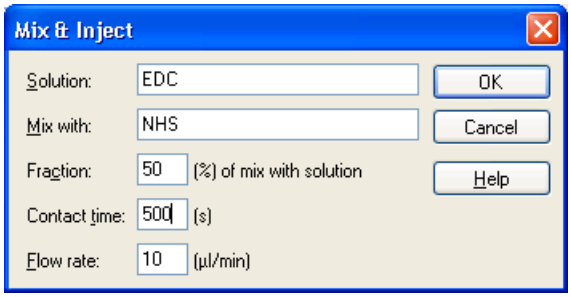
↓



コピーしたメソッドの各項目の条件を変更することができます。変更したいコマンドをダブルクリックするか、またはクリックして **Edit...**をクリックします。

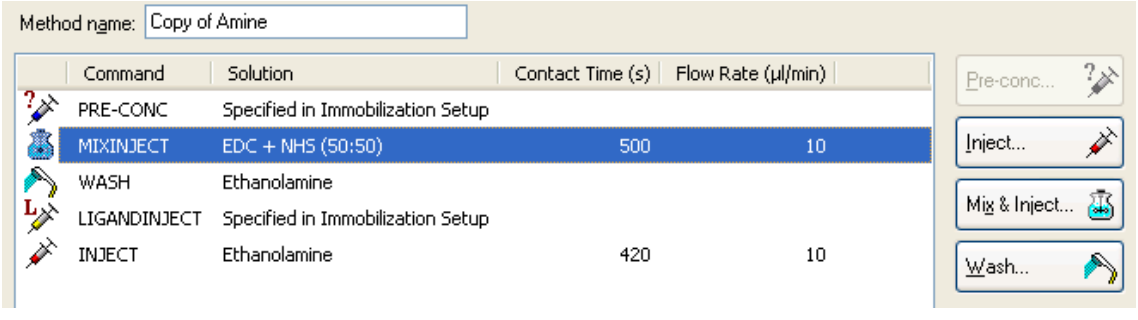
↓

（例）EDC/NHS の項目

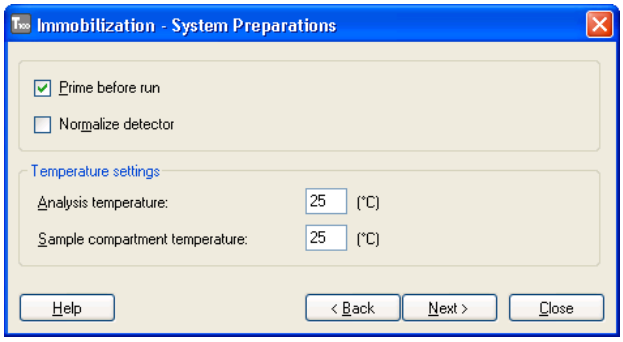


必要に応じて流速および添加時間を変更後、**OK** をクリックします。

↓



変更後、右下の **OK** をクリックします。



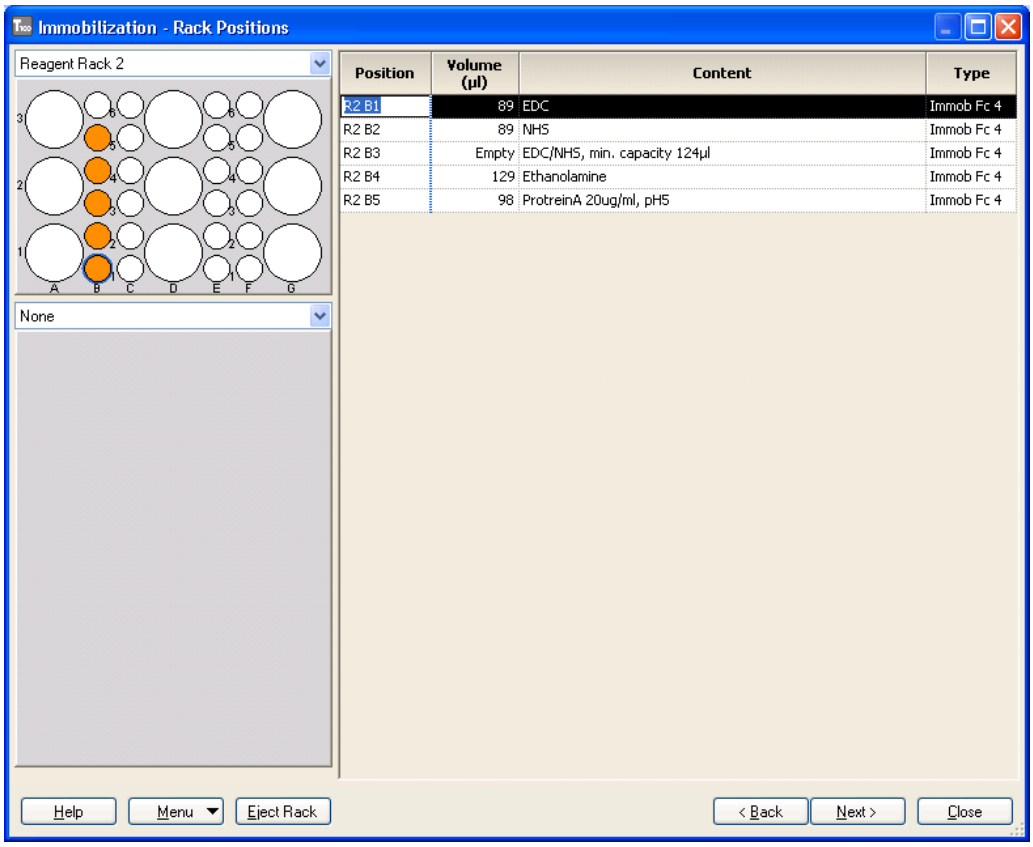
固定化操作を始める前に、**Prime** および **Normalize** の設定が可能です。

Temperature settings

Analysis temperature	25℃
Sample compartment temperature	25℃

Next >をクリックします。

↓



右側の表で試薬の位置と必要量（µl）を確認します。表をクリックすると対応する左側のラック上のバイアル位置が強調表示になります。位置と必要量を確認しながらバイアルをラックにセットします。

EDC	89 µl/ 7 mm プラスチックバイアル
NHS	89 µl/ 7 mm プラスチックバイアル
空（NHS/EDC 混合用）	空/ 7 mm プラスチックバイアル
Ethanolamine	129 µl/ 7 mm プラスチックバイアル
Ligand	98 µl/ 7 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わります。

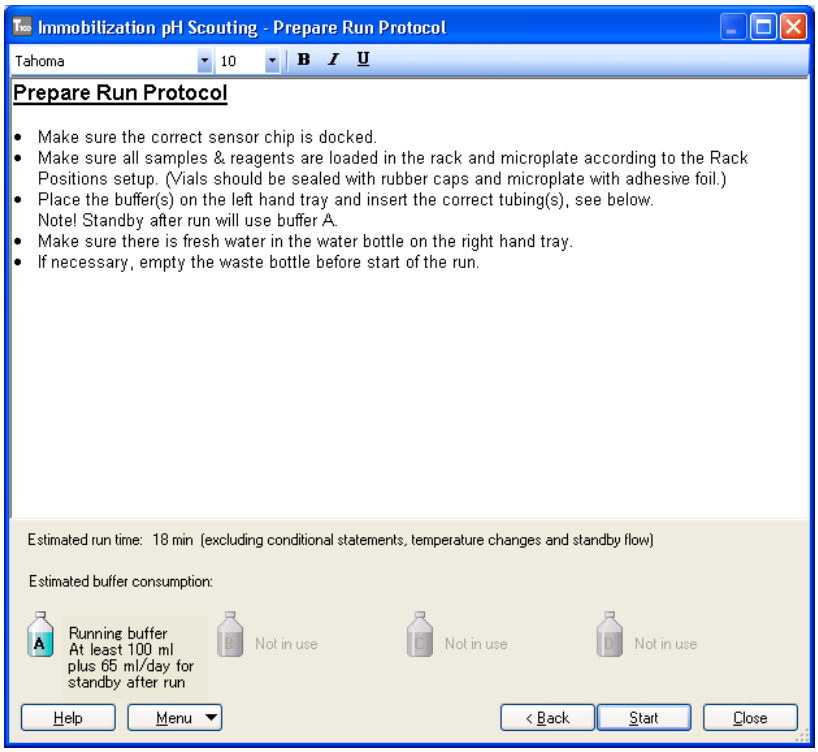
↓

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入して、**OK** をクリックします。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックします。

↓


Immobilization pH Scouting - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 18 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
A
Running buffer
At least 100 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
B
Not in use
C
Not in use
D
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、固定化時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測

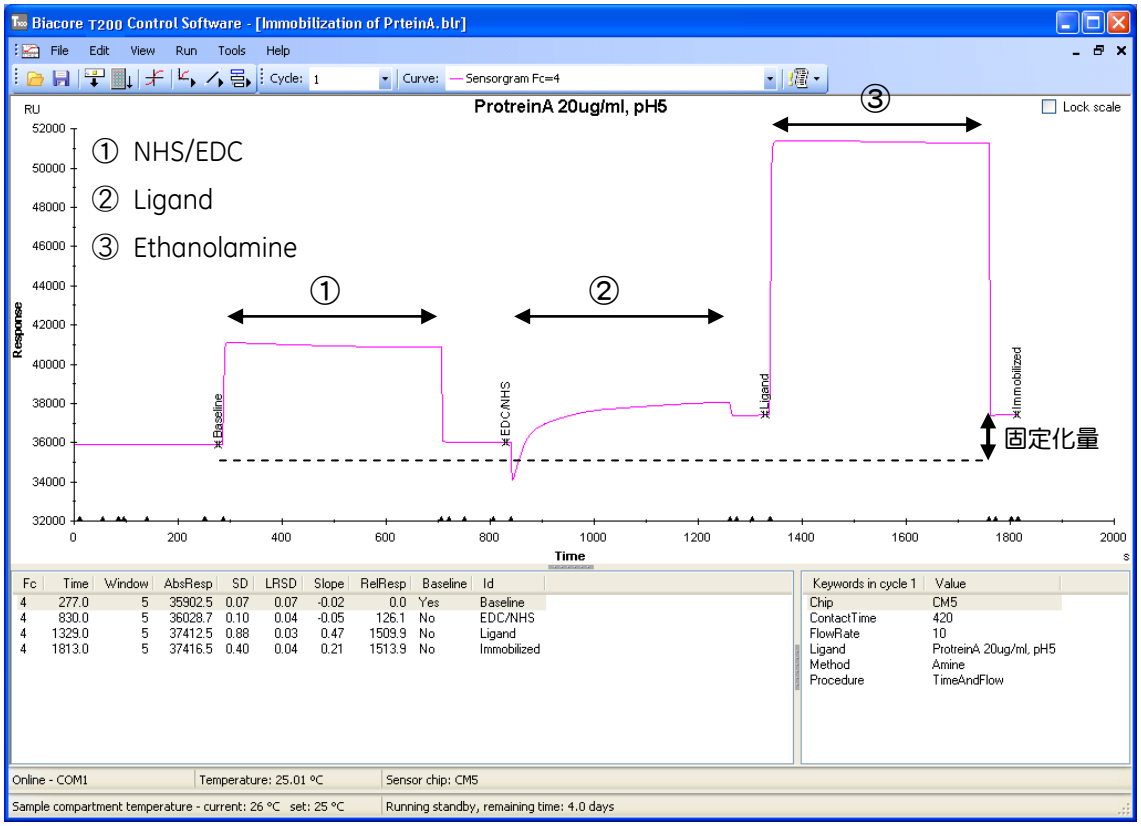
定がスタートします。

↓

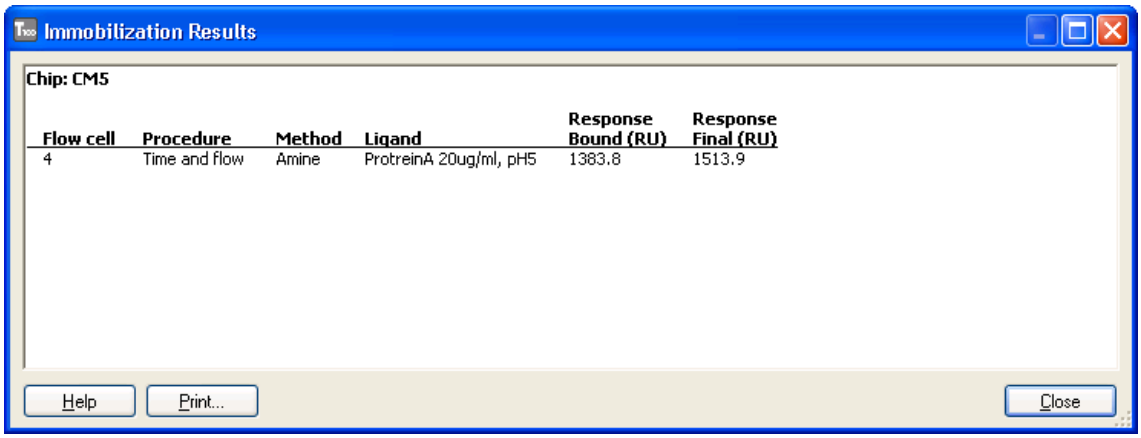
固定化終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。測定データは、入力したファイル名で自動的に保存されます。

補足 3-3. 緊急停止

測定開始後、プログラムを緊急停止したい場合には、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押してください。



固定化量（RU）が別途表示されます。



補足 3-4. 固定化量の確認

固定化量として Response Bound と Response Final の 2 種類が表示されます。

Bound　リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差

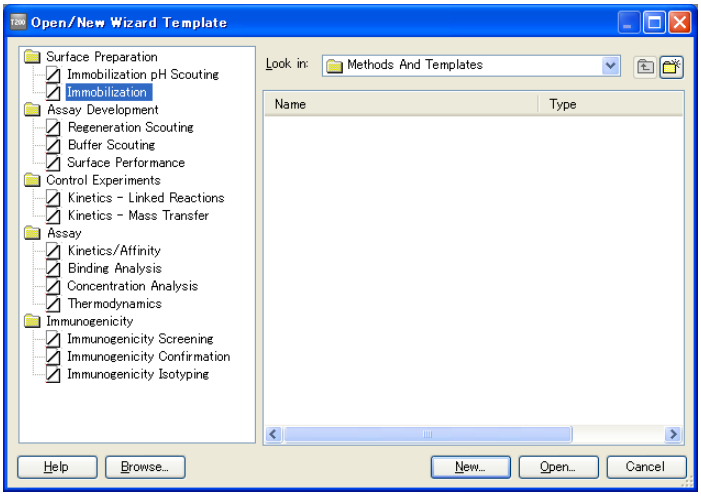
Final　NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差

リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Final のレスポンスは Bound より小さくなります。また、固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されている）エタノールアミンが導入されるため、Final のレスポンスは Bound より大きくなることがあります。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用してください。

3-1-3. 固定化量を調節して固定化

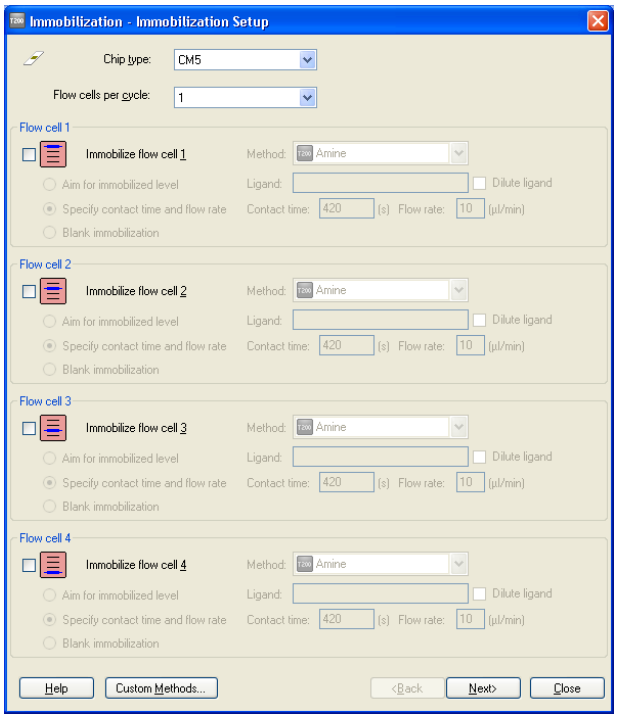
反応速度定数の算出を目的とした実験の場合、固定化量を少なく調節する必要があります。この場合、リガンドの添加方法として **Aim for Immobilized level** を使用すると便利です。固定化量をできるだけ多くしたい場合には、この方法は不向きです。この場合は、リガンド添加時間を長くして固定化してください。（補足 3-2 参照。）

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックします。



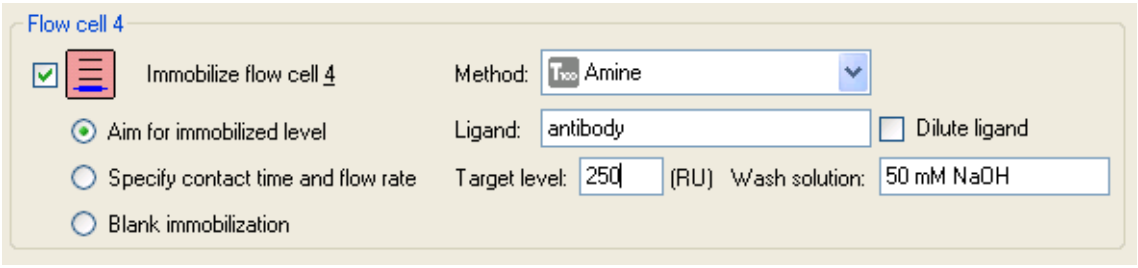
Surface Preparation → **Immobilization** を選択した後、**New...**をクリックします。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックします。

↓



Chip type のプルダウンメニューで、使用するセンサーチップ（**CM5**）を選択します。

↓



固定化する **Flow cell** を選択します。**Aim for immobilized level** にチェックを入れます。

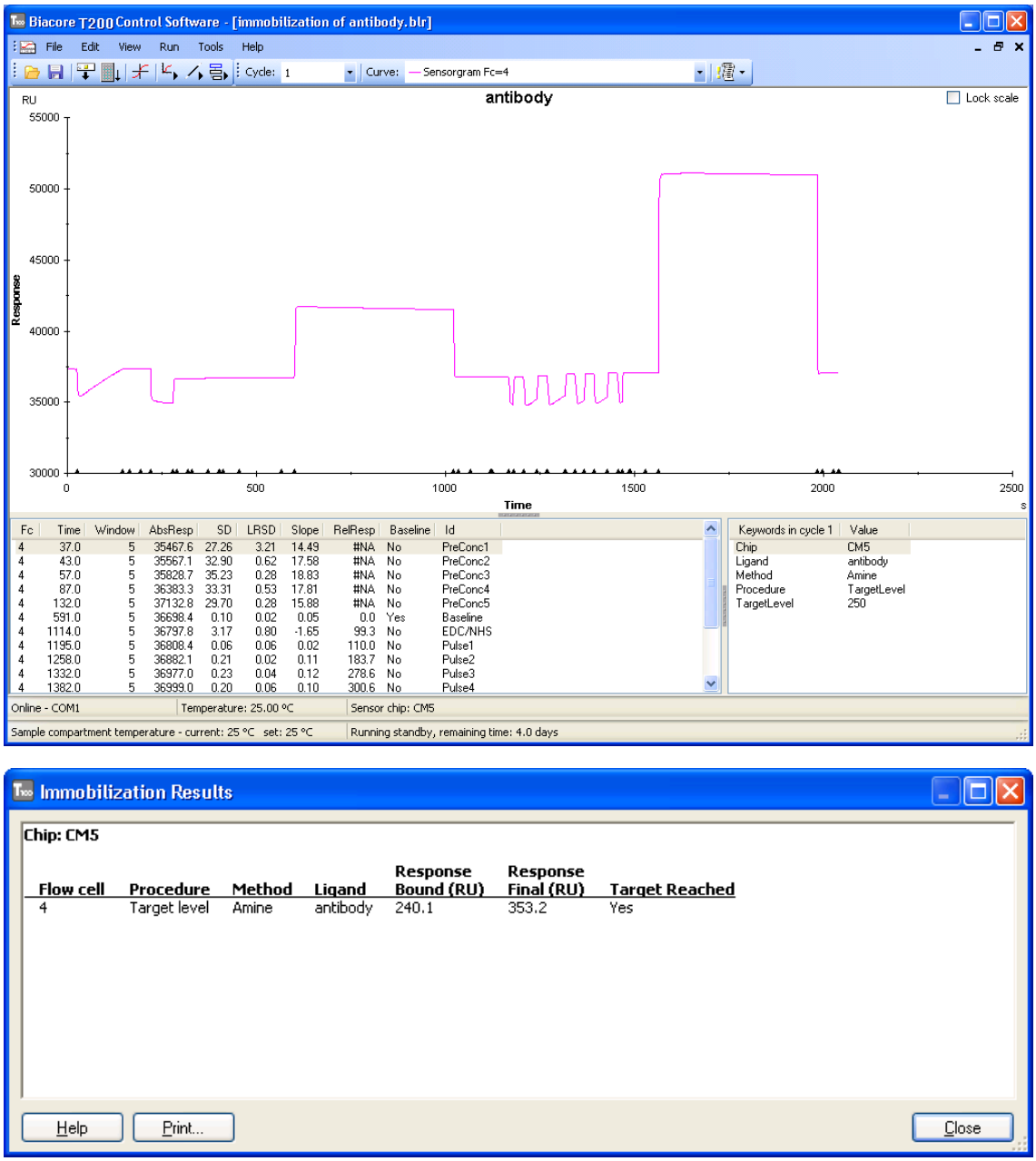
Method	固定化方法	**Amine** を選択
Ligand	リガンドの名称	
Target level	目標固定化量（RU）	
Wash solution	固定化前のリガンドテスト添加後のチップ表面洗浄液（50 mM NaOH）	

各項目に情報を入力後、**Next >**をクリックします。

↓

以下測定方法は、37～40 ページを参照してください。

↓

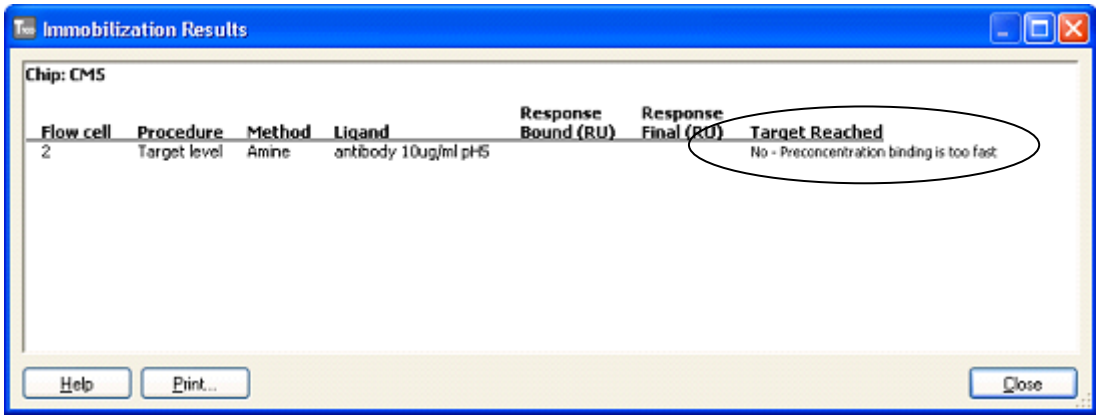

Biacore T200 Control Software - [immobilization of antibody.blr]
File Edit View Run Tools Help
Cycle: 1
Curve: Sensorgram Fc=4
antibody
RU
Lock scale
Response
Time
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
4 37.0 5 35467.6 27.26 3.21 14.49 #NA No PreConc1
4 43.0 5 35567.1 32.90 0.62 17.58 #NA No PreConc2
4 57.0 5 35828.7 35.23 0.28 18.83 #NA No PreConc3
4 87.0 5 36383.3 33.31 0.53 17.81 #NA No PreConc4
4 132.0 5 37132.8 29.70 0.28 15.88 #NA No PreConc5
4 591.0 5 36698.4 0.10 0.02 0.05 0.0 Yes Baseline
4 1114.0 5 36797.8 3.17 0.80 -1.65 99.3 No EDC/NHS
4 1195.0 5 36808.4 0.06 0.06 0.02 110.0 No Pulse1
4 1258.0 5 36882.1 0.21 0.02 0.11 183.7 No Pulse2
4 1332.0 5 36977.0 0.23 0.04 0.12 278.6 No Pulse3
4 1382.0 5 36999.0 0.20 0.06 0.10 300.6 No Pulse4
Keywords in cycle 1 Value
Chip CM5
Ligand antibody
Method Amine
Procedure TargetLevel
TargetLevel 250
Online - COM1
Temperature: 25.00 °C
Sensor chip: CM5
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C
Running standby, remaining time: 4.0 days

Immobilization Results
Chip: CM5
Flow cell Procedure Method Ligand Response Bound (RU) Response Final (RU) Target Reached
4 Target level Amine antibody 240.1 353.2 Yes
Help
Print...
Close

Immobilization Results ダイアログに固定化量（RU）が表示されます。目標固定化量に到達したかは、**Target Reached** に表示されます。最終的な固定化量は、前章と同様に値が小さい Response を採用してください。

補足 3-5. 固定化ウィザードの中断

このウィザードでは NHS 活性化前に、リガンド溶液をテスト添加し、濃縮効果が得られるか、また、その結果から目的の固定化量が調節できる条件であるかを判断します。
リガンド条件に問題がある場合、この時点でプログラムが自動的に終了します。リガンドは固定化されていないので、リガンド溶液を調製し直し、同じフローセルに再度固定化を試みてください。



Preconcentration binding is too fast

濃縮効果が強すぎ、添加時間を短くしても目標のレベル以上固定化されると判断された場合に表示されます。希釈緩衝液の pH を上げるか、リガンド濃度を下げる必要があります。

Preconcentration binding is too slow

濃縮効果が不十分または観察されず、添加時間を長くしても目標のレベルまで固定化できないと判断された場合に表示されます。希釈緩衝液の pH を下げるか、リガンド濃度を上げる必要があります。

4. マニュアル測定による相互作用の条件検討

マニュアル操作により、アナライトの特異的結合を確認します。必要であれば、引き続き、再生条件を検討します。再生条件が決まったら、同一濃度のアナライトを添加し、再現性を確認します。
なお、シングルサイクル法で速度定数・解離定数を算出する場合には、再生条件の検討は必要ありません。

アナライト

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加する分子を指します。血清や培養上清等のクルード（crude）なサンプルを使用できますが、不溶性の粒子などは遠心などで除去してください。反応速度定数や解離定数算出を目的とした実験の場合は、アナライトの精製度が高く、モル濃度が既知である必要があります。

アナライトの調製

ランニング緩衝液で希釈してください。希釈できない場合は、ゲルろ過などを使用してランニング緩衝液で緩衝液交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件に合わせることが必要となります。緩衝液が異なる場合には、溶液効果（Bulk Effect：ランニング緩衝液と添加溶液（アナライトなど）の密度の差により発生するレスポンスの差）が発生します。反応速度定数や解離定数の算出を目的とした実験においては、結合領域（アナライト溶解液）と解離領域（ランニング緩衝液）が異なる緩衝液組成条件下の測定になり、解析結果に影響を与える可能性があります。

アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよりますが、数十 ng/ml～数百 µg/ml で測定します。反応速度定数を算出する場合には、予想される K_D（解離定数）値の 1/10～10 倍のモル濃度で解析すると良好な結果が得られます。予備検討時は、結合が弱いことや再生条件（リガンドに結合したアナライトを溶出し、リガンド固定化表面を固定化直後の状態に再生する操作）を検討する必要性を考慮し、高濃度（タンパク質アナライトの場合、数～数十 µg/ml）を用いるのが望ましいです。

リファレンスセル

溶液効果および非特異的吸着を差し引くために、必ずリファレンスセルへもアナライトを添加してください。リファレンスセルは、未処理のセル、活性化・ブロッキングセル、ネガティブコントロール固定化セルなどを利用します。

再生溶液

リガンドに結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生といいます。解離が速い相互作用では、ランニング緩衝液が流れることで、短時間でアナライトが完全に解離するため再生の必要がありません。解離速度が遅い相互作用の場合には、適当な塩、酸、アルカリ溶液をアナライト結合表面に 30 秒～1 分間添加し再生します。至適な再生条件（どの溶液で何分間、何回添加するか）は、分子間ごとに異なるため、その都度検討が必要となります。

理想的な再生条件

リガンドの活性が失われない条件
アナライトを完全に解離する条件
リガンドがセンサーチップ表面から遊離しない条件

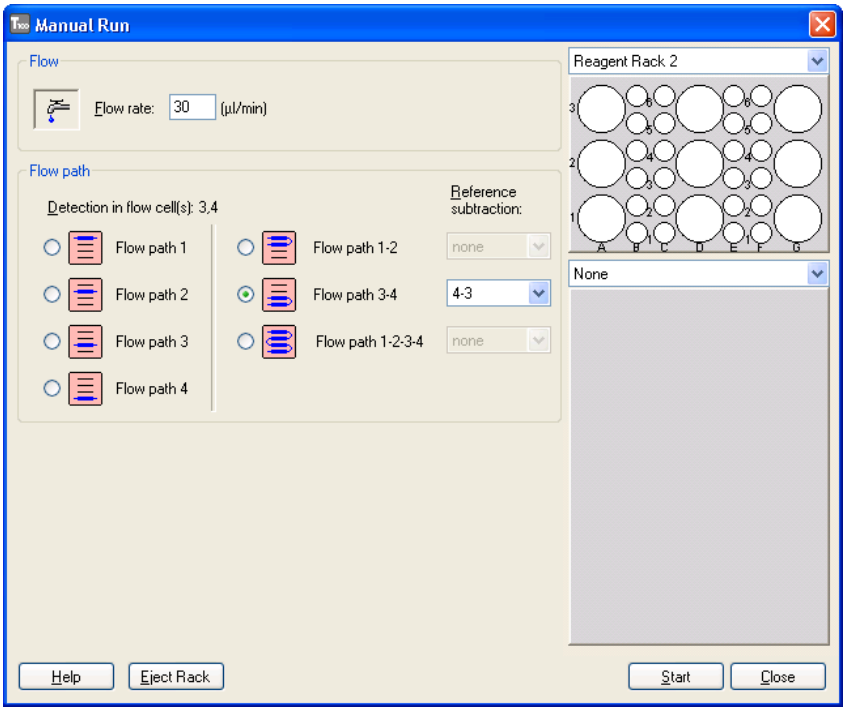
補足 4-1. 再生溶液の種類

再生溶液は通常以下のようなものが使用されます。検討の際にはマイルドな条件から検討してください（塩溶液→酸溶液→アルカリ溶液）。添加時間は、1 分以内で検討します。

試薬	濃度あるいは pH
塩	
NaCl	< 2 M
酸性条件	
10 mM Gly-HCl	> pH 1.5
HCl	< 100 mM
Phosphoric acid	< 100 mM
Formic acid	< 20 %
アルカリ条件	
10 mM Gly-NaOH	< pH 12
NaOH	< 100 mM
Ethanolamine	< 100 mM
Ethanolamine-HCl	< 1 M
キレート剤　多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	< 0.35 M
界面活性剤	
Surfactant P-20　(Tween 20)	< 5 %
Triton X-100	< 5 %
SDS	< 0.5 %
Octylglucoside	< 40 mM
有機溶媒	
Acetonitrile	< 20%
DMSO	< 8%
Ethylene glycol in HBS Buffer	< 50%
Ethanol	< 20%
Formamide	< 40%
変性剤	
Guanidine-HCl	< 5M
Urea	< 8M

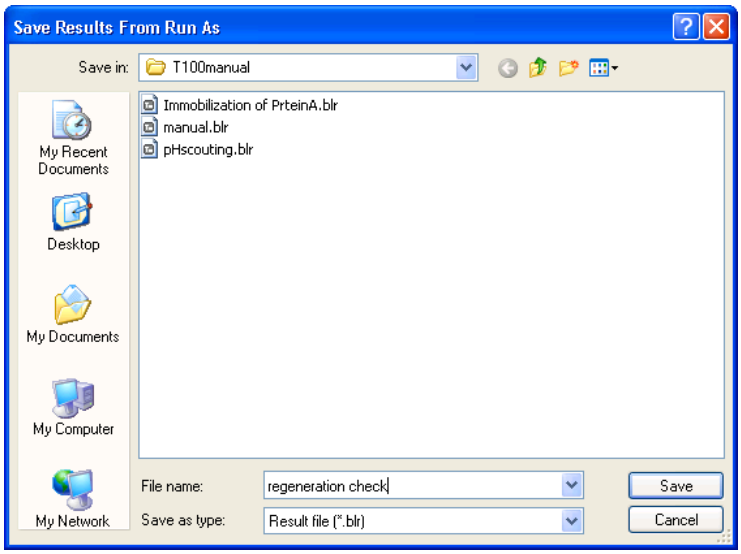
Toolbar の **Start Manual run** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Manual run** をクリックします。

↓



流速（**Flow rate**）（30 µl/min）を入力します。**Flow path** でアナライトを添加するリファレンスセルと固定化セルを選択します。必ず、**Reference subtraction** でリファレンスセルの差し引きを設定します。（選択肢として 2-1, 4-3 または、2-1, 3-1, 4-1 があります。）
Rack の種類を選択し、**Start** をクリックします。

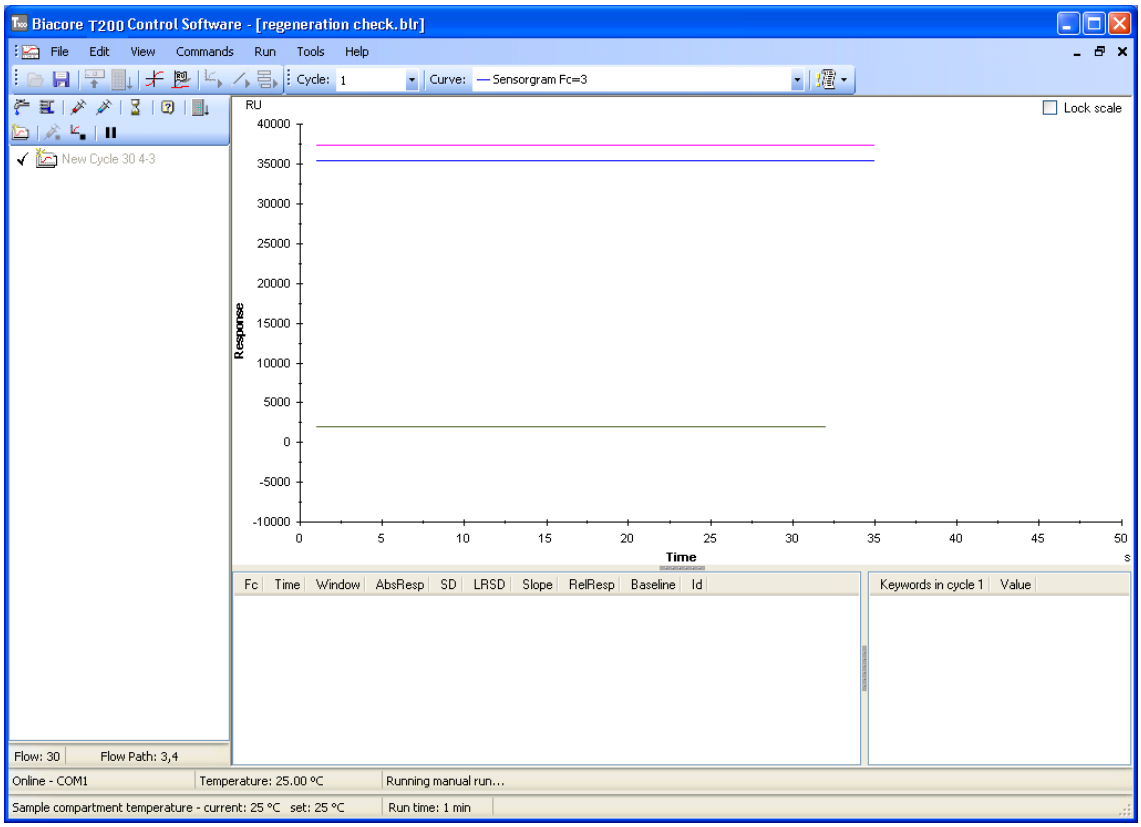
↓



測定結果の保存先を指定し、**File name** を入力して **Save** をクリックします。

↓

センサーグラムが表示され測定が開始されます。


Biacore T200 Control Software - [regeneration check.blr]
File Edit View Commands Run Tools Help
Cycle: 1
Curve: Sensorgram Fc=3
New Cycle 30 4-3
RU
Lock scale
Response
Time
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
Keywords in cycle 1 Value
Flow: 30 Flow Path: 3,4
Online - COM1 Temperature: 25.00 °C Running manual run...
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C Run time: 1 min

補足 4-2. センサーグラムの表示変更

View → Show Only Current Curve

選択したセンサーグラムを 1 本表示します。

右上のカーブリストから、表示するセンサーグラムを選択します。

View → Show All Curves

すべてのセンサーグラムを表示します。

View → Show Curves of Same Type

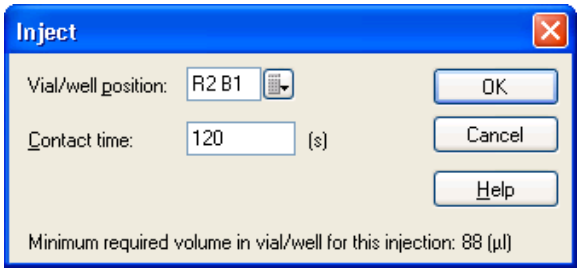
センサーグラムを種類別に表示します。

右上のカーブリストから、各フローセルのセンサーグラムもしくは差し引きセンサーグラムのいずれかを選択して表示することができます。

↓

Inject command アイコン（ ；赤色）または **Menu bar** の **Commands → Inject...**を選択します。

↓



アナライトの位置（**Vial/well position**）および、添加時間（**contact time**）60～120 秒を入力すると、**Inject** ダイアログの右下に必要なサンプル量が表示されます。

↓

一旦、**Cancel** をクリックし、**Eject rack tray** アイコン（ ）または Menu bar の **Commands** → **Eject Rack** を選択します。

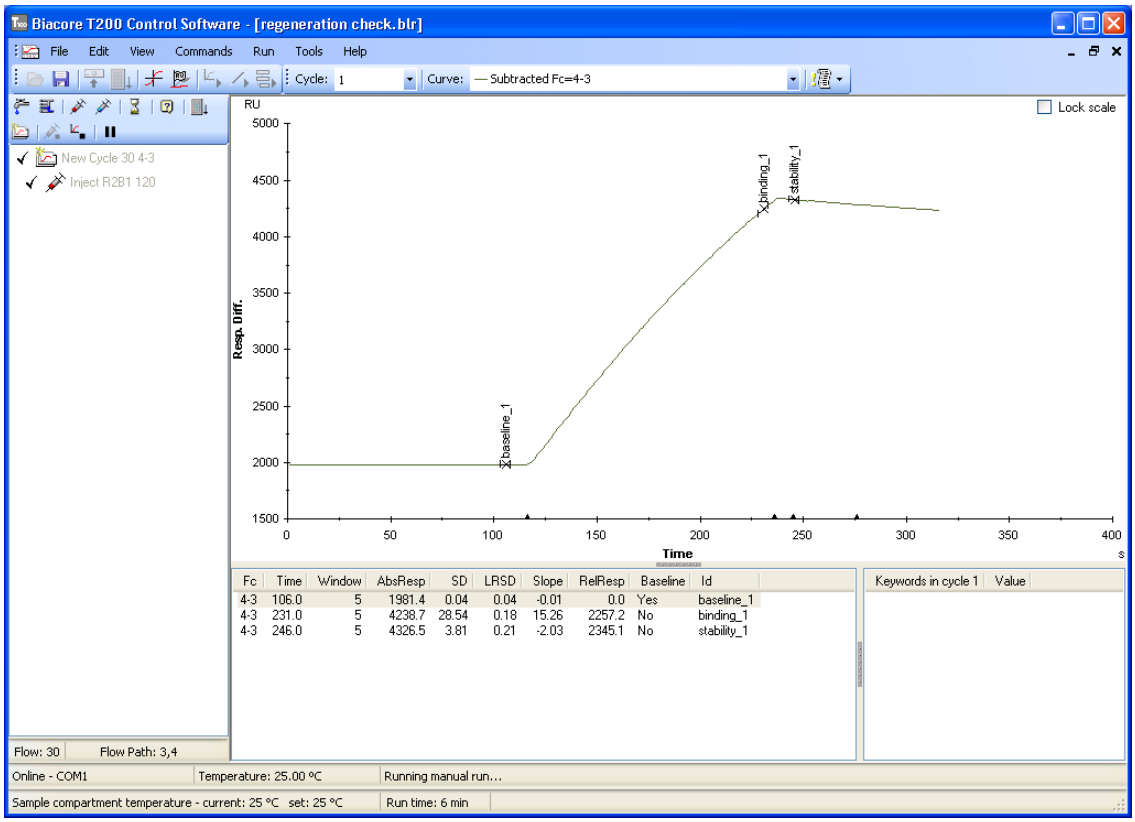
ラックトレイを取り出して、アナライトを分注したバイアルをセットします。ラックトレイを再び本体に戻して **OK** をクリックします。

Inject command アイコンを選択します。

↓

アナライトの位置および添加時間（s）を入力します。**OK** をクリックします。

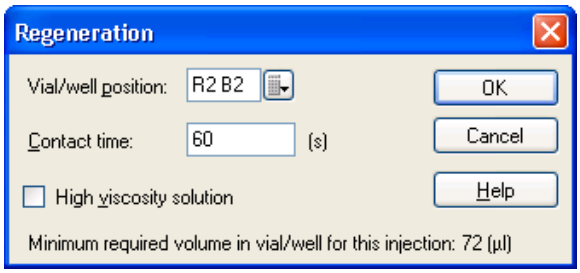
↓


Biacore T200 Control Software - [regeneration check.blr]
File Edit View Commands Run Tools Help
Cycle: 1
Curve: Subtracted Fc=4-3
New Cycle 30 4-3
Inject R2B1 120
RU
Lock scale
Resp. Diff.
Time
s
baseline_1
binding_1
stability_1
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
4-3 106.0 5 1981.4 0.04 0.04 -0.01 0.0 Yes baseline_1
4-3 231.0 5 4238.7 28.54 0.18 15.26 2257.2 No binding_1
4-3 246.0 5 4326.5 3.81 0.21 -2.03 2345.1 No stability_1
Keywords in cycle 1 Value
Flow: 30 Flow Path: 3,4
Online - COM1 Temperature: 25.00 °C Running manual run...
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C Run time: 6 min

アナライトの結合を確認します。再生の必要がある場合には引き続き検討します。

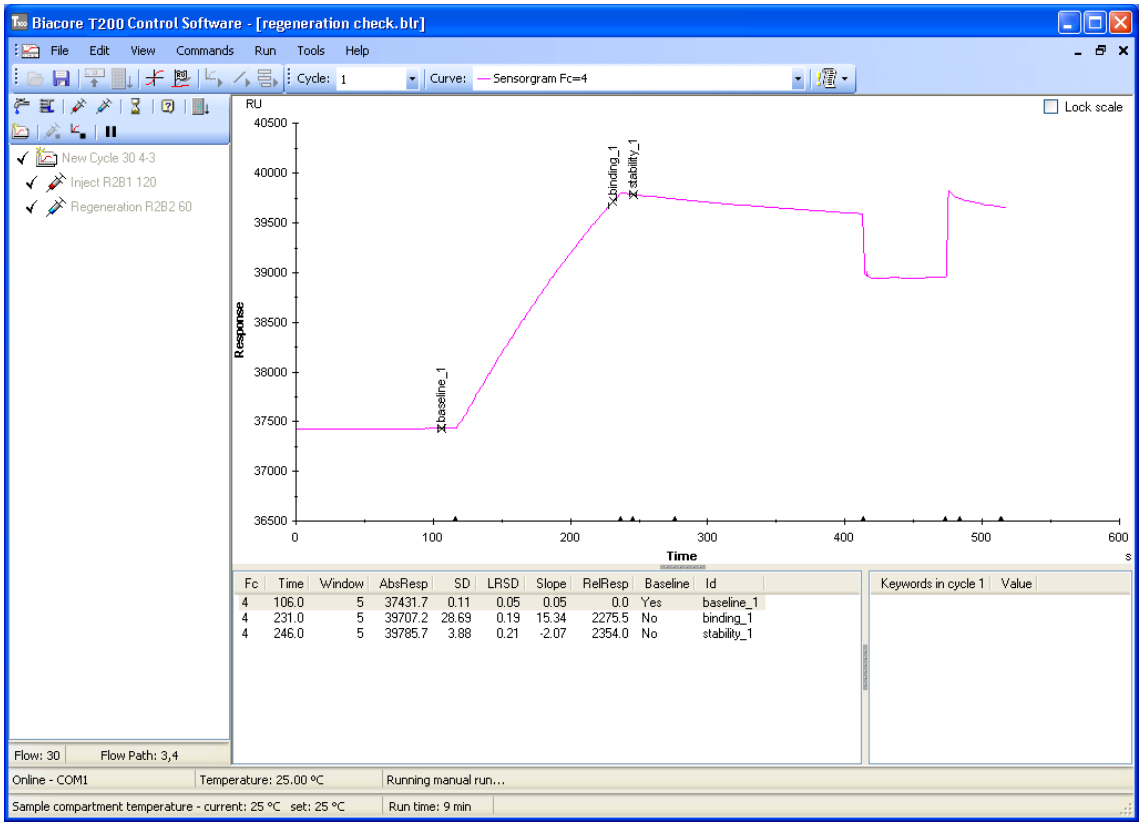
Regeneration command アイコン（ ；青色）または **Menu bar** の **Commands** → **Regeneration...**を選択します。

↓



再生溶液の位置および添加時間（30～60s）を入力して、**OK** をクリックします。
（再生溶液をセットしていない場合には、必要容量確認後、一旦、**Cancel** をクリックしてバイアルをセットします。）

↓



↓

レポートポイントまたはリファレンスラインウィンドウを利用して、再生溶液添加後のレスポンス（RU）が、アナライト添加前のレスポンス（RU）に近いかどうかを確認します。
不十分な場合には、引き続き検討します。

↓

固定化リガンドの活性および再現性を確認します。

New Cycle アイコン（ ；アイコンが並んでいる下段左から 1 番目）をクリックし、測定サイクルを切り替えます。同濃度のアナライトを添加し、前回のアナライト結合レスポンスと比較してください。引き続き再生します。

↓

すべての検討が終了したら、**End Manual run** アイコン（ ）または Menu bar の **Commands** → **End Run** をクリックします。装置は自動的に **Standby flow** 状態になります。
測定データははじめに入力したファイル名で自動的に保存されます。

補足 4-3. リファレンスウィンドウを利用した再生の確認方法

Tool bar の **Reference Line** アイコン（ ）あるいは **View** → **Reference Line** をクリックし、センサーグラム上にリファレンスラインを表示させます。同時にセンサーグラム左上にリファレンスラインウィンドウ（

）が表示されます。

↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線上に移動後、マウスの左ボタンをドラッグし、ベースラインを取りたい時間に移動します。もしくはベースラインを取りたい場所のセンサーグラム上の位置でカーソルをクリックし、リファレンスラインを移動します。

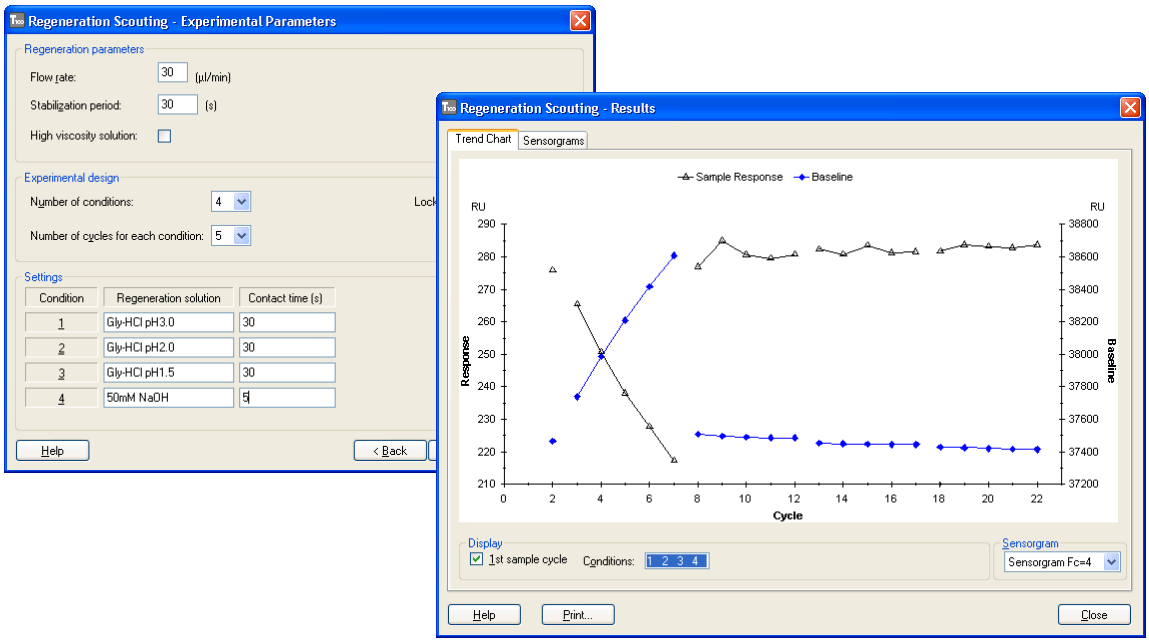
↓

View → **Base Line** をクリックする（もしくは F9 ボタンを押す）と、リファレンスラインウィンドウのレスポンスが相対値 0 となります。リファレンスラインの縦軸にもう一度カーソルをあわせ、左ボタンでドラッグし移動させると、リファレンスウィンドウにベースラインとして設定した位置からのレスポンスが表示されます。

補足 4-4. ウィザードを用いた再生条件の検討

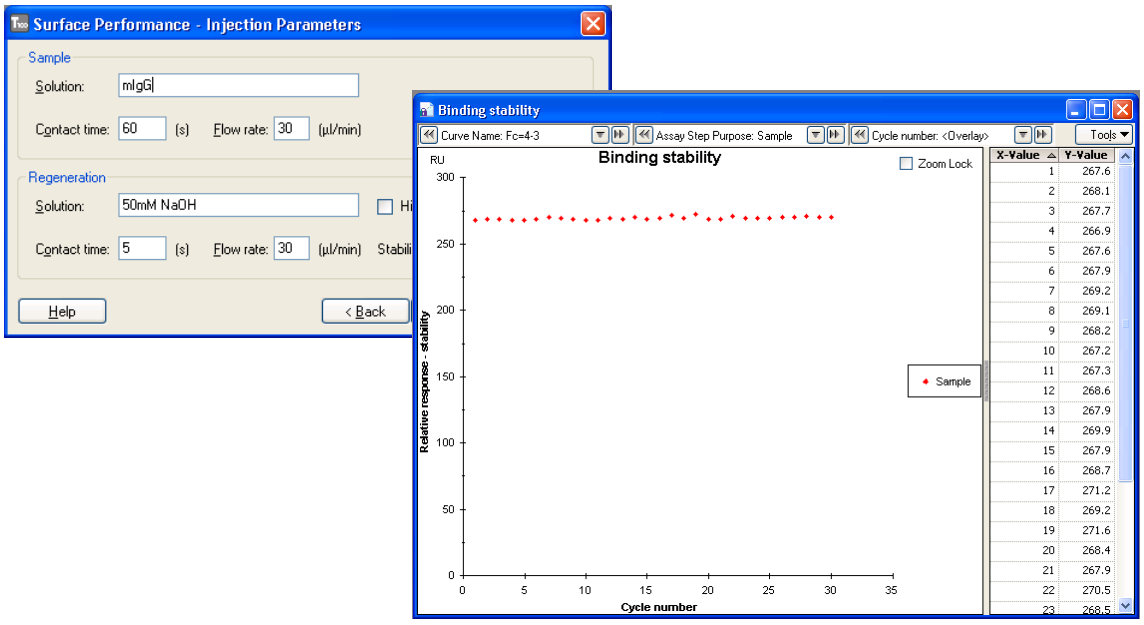
Application Wizard/ Assay Development/ **Regeneration Scouting**

複数の再生溶液を用いて、各再生溶液で設定した添加条件で、最大 5 回まで、アナライト結合量の変化とベースラインの安定性を評価できます。



Application Wizard/ Assay Development/ **Surface Performance**

決定した再生条件でセンサーチップの安定性を評価できます。400 回までの繰り返し測定が可能です。



5. 相互作用測定

実験目的に応じたウィザードまたはメソッドのテンプレートに、サンプル名や添加情報および再生条件等、必要事項を入力するだけで、プログラムを組み立てることができます。この章では、反応速度定数および解離定数の算出（マルチサイクル法およびシングルサイクル法）のテンプレートを利用した基本的なプログラム作成について記載します。その他アプリケーションの測定方法および解析手法は、「BiacoreT200 日本語取扱説明書　応用編」をご覧ください。メソッド作成方法の詳細は 6 章を参照してください。

ウィザードテンプレートを利用

反応速度定数および解離定数の算出　マルチサイクル法	Kinetics/Affinity	54 ページ
濃度測定	Concentration Analysis	応用編
結合の有無の確認、スクリーニング	Binding Analysis	応用編
熱力学的パラメータの算出	Thermodynamics	応用編
低分子化合物アナライトの反応速度定数および解離定数の算出	Kinetics/Affinity	応用編
免疫原性試験	Immunogenicity	応用編

メソッドテンプレートを利用

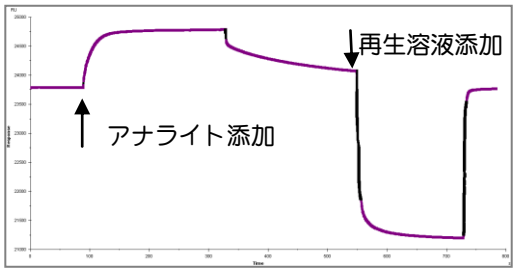
反応速度定数および解離定数の算出　シングルサイクル法	Single-cycle kinetics	93 ページ
検量線不要の濃度測定	Calibration-Free Concentration	応用編
低分子化合物アナライトのスクリーニング	LMW screen	応用編
結合アナライトの回収	Inject and recover	応用編

5-1. 反応速度定数・解離定数の算出　マルチサイクル法

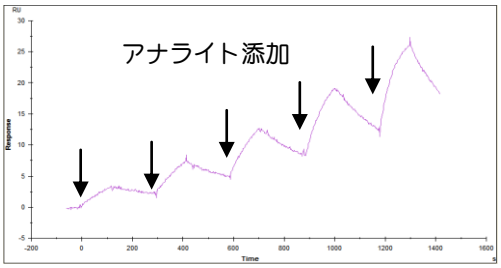
マルチサイクル法とシングルサイクル法

1 濃度のアナライト添加とリガンドの再生操作を 1 サイクルとして、濃度が異なるアナライトを繰り返し測定し、得られたセンサーグラムから反応速度定数・解離定数を算出する方法をマルチサイクル法といいます。一方、異なるアナライト濃度系列を再生操作なしに低濃度側から連続添加し、得られたセンサーグラムを利用して反応速度定数・解離定数を算出する方法をシングルサイクル法といいます。

マルチサイクル法



シングルサイクル法



アフィニティーとカイネティクス

分子同士が相互作用する時には、両者にはアフィニティー（親和性）があると表現します。解離定数は、アフィニティーの強さを表す尺度として一般的に使用され、K_D（単位 M）として記述されます。その逆数 1/ K_D（= K_A、単位 1/M）が用いられることもあります。解離定数は、A+B⇔AB 反応の平衡状態において、K_D = ［A］［B］/［AB］と定義されます。形成される複合体の割合が多いほど、つまり、この数値が小さいほどアフィニティーは強いと表現できます。Biacore を用いたカイネティクス解析では、アフィニティーは、その分子間の反応速度定数から算出します（ $K_D = k_d / k_a$ ）。速い結合および遅い解離の相互作用ほど、アフィニティーは強くなります。これら反応速度（カイネティクス）に関するパラメータは、結合速度定数（k_a、単位 $M^{-1}s^{-1}$）、解離速度定数（k_d、単位 s^{-1}）として表現されます。

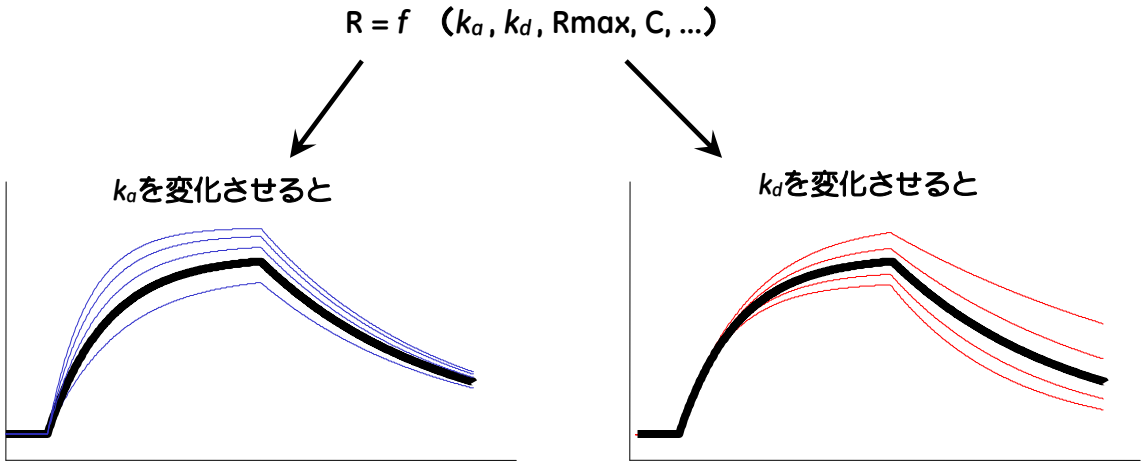
$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB$$

$$K_D = k_d / k_a$$

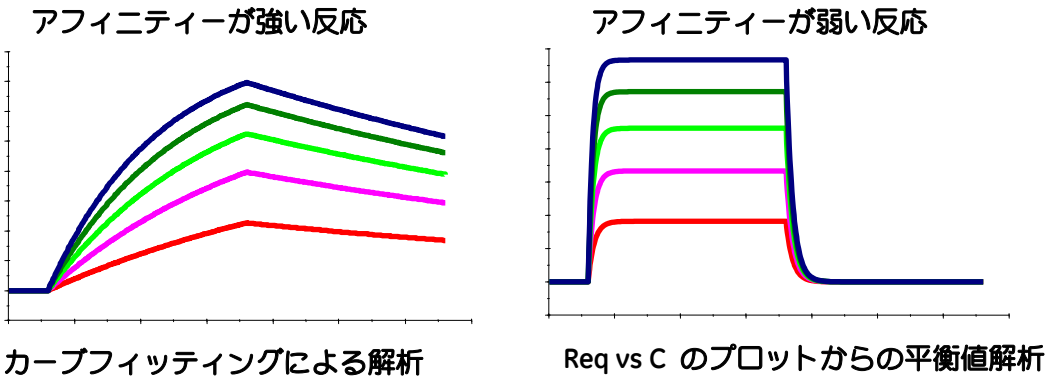
$$K_A = k_a / k_d$$

解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a、k_d）の算出方法

カイネティクス解析では、得られたセンサーグラムに直接反応速度式をカーブフィッティングさせ、非線形最小二乗法により定数を導き出します。

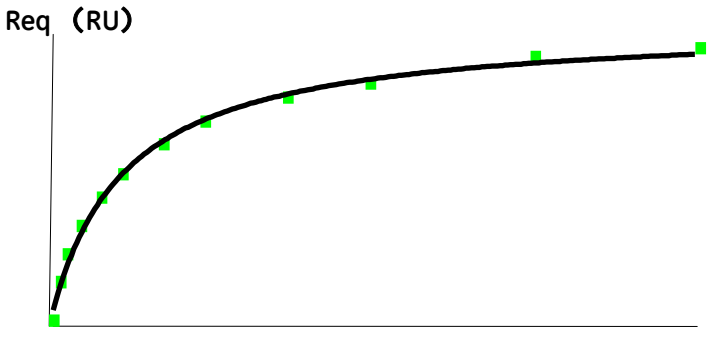


アフィニティーの弱い（≒結合解離が速い）相互作用の場合、反応はきわめて速く平衡状態（Req）へと移行しますが、複合体の安定性は悪いため、センサーグラムは『箱型』となります。結合領域および解離領域はきわめて短く、カーブフィッティングによる反応速度定数の算出は困難です。



このような場合、アナライト濃度（C）に対する平衡値（Req）のプロットから、親和定数（K_A）あるいは解離定数（K_D）を算出します。平衡状態では、以下の関係式が成り立ちます。

$$Req = C \times R_{max} / (C + K_D)$$



至適なアナライト濃度

良好な結果を得るためには、予想される解離定数（K_D）値の 1/10～10 倍の濃度で測定します。結合速度または解離速度が遅く、結合領域のセンサーグラムの傾きが直線的な場合には、センサーグラムのカーブが得られる高濃度領域も測定すると良好な解析結果が得られます。また、5 段階以上の濃度系列と濃度 0（アナライトを含まない緩衝液のみ）について測定し、1 濃度については再現性の確認目的で 2 回（n=2）測定します。

アフィニティーが弱く、箱型のセンサーグラムになり、カイネティクス解析が困難な場合は、10 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定します。濃度範囲は高濃度側まで幅広くとることを推奨します。

至適な流速

30 µl/min 以上の高流速に設定します。

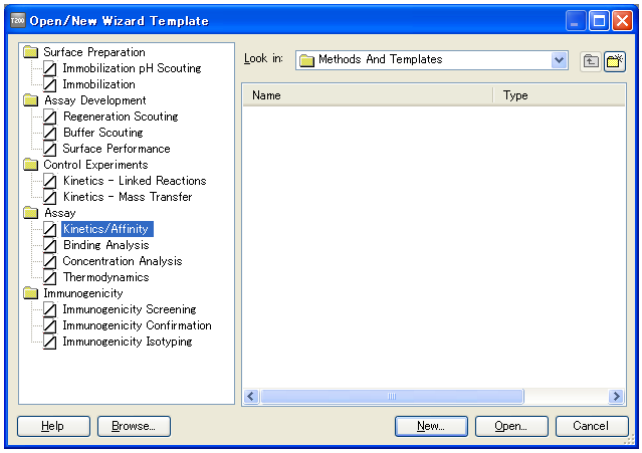
アナライト添加時間と解離時間

通常は、添加 2 分程度、解離 2 分程度で測定します。ただし、結合速度が遅く結合領域のセンサーグラムが直線的な場合には、カーブが得られるよう添加時間を 5～10 分程度にします。また、解離速度が遅く、解離領域の傾きがほとんど確認できない場合には、解離時間を 10～30 分程度で測定します。

5-1-1. プログラムの実行

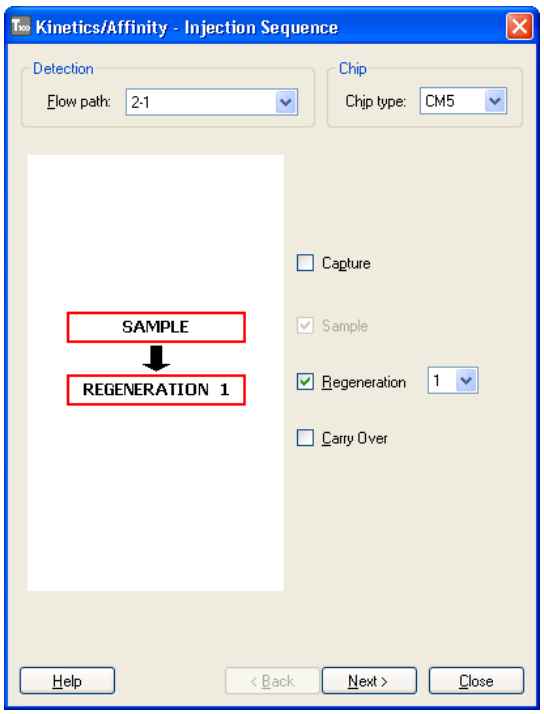
Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックします。

↓



Assay → **Kinetics/Affinity** を選択した後、**New...**をクリックします。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックします。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path　2-1 または 4-3 から選択します。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップの種類を選択します。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされます。

Sample

アナライトの添加。

Regeneration

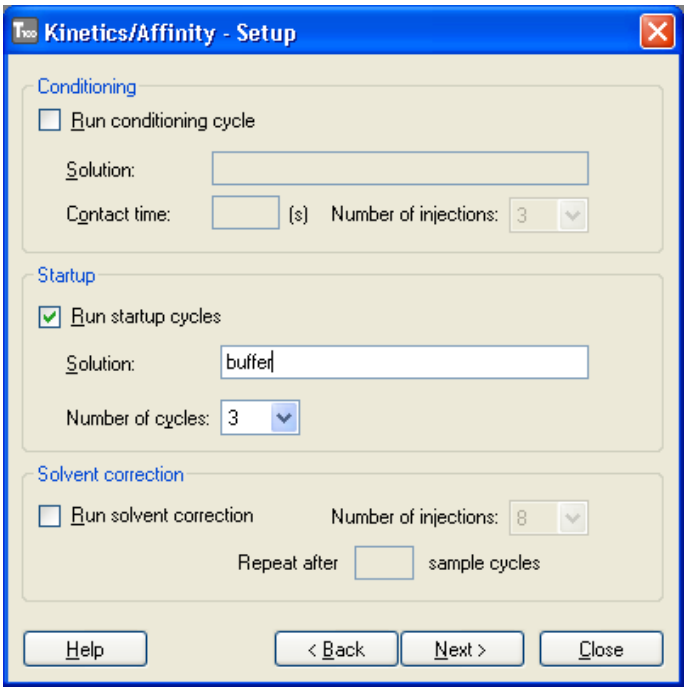
再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数を選択します。(1 or 2 回)

Carry Over

アナライト添加後、アナライトがキャリーオーバーするかどうかランニング緩衝液を添加して確認する場合にチェックします。

Next >をクリックします。

↓



ダミーランサイクルを設定します。

Startup

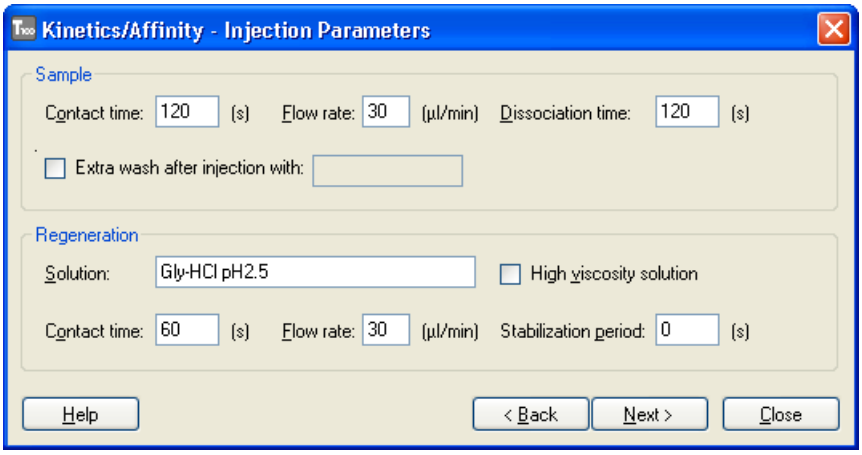
Solution　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施します。通常は、ランニング緩衝液を

用います。

Number of cycles　サイクル数です。3 回以上を推奨します。

Next >をクリックします。

↓



Sample

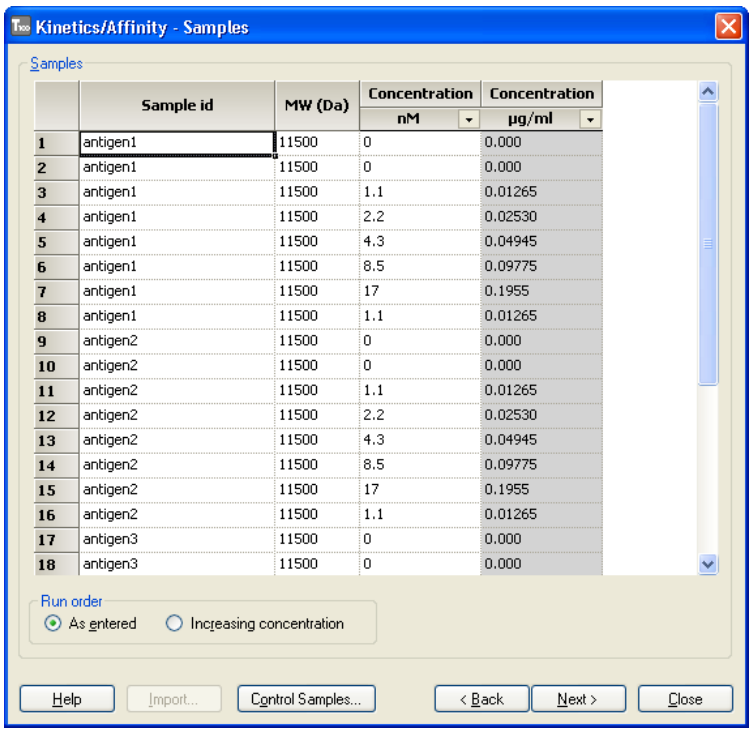
contact time	アナライトの添加時間	通常 120 s
Flow rate	流速	通常 30 µl/min
Dissociation time	解離時間	通常 120 s

Regeneration（再生条件を検討し、確定した条件を入力します）

Solution	再生溶液の名称
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40% エチレングリコール以上）の場合はチェックを入れてください。
contact time	再生溶液の添加時間
Flow rate	流速
Stabilization period	再生溶液添加後のベースライン安定化時間（必要に応じて設定します。）

入力後、**Next >**をクリックします。

↓

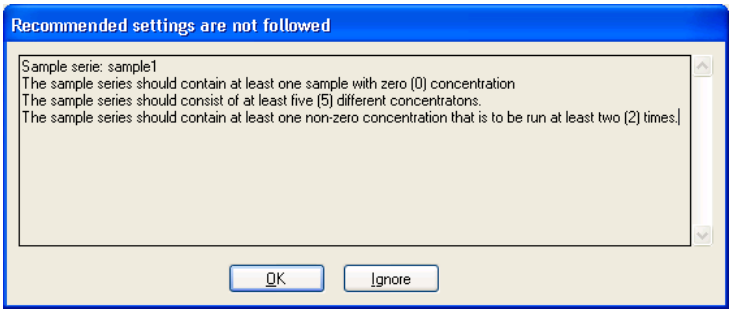


Sample id	アナライトの名称
MW　(Da)	アナライトの分子量
Concentration	アナライトの濃度（単位も選択） 分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM ”と“重量濃度 µg/ml”を換算します。

入力後、**Next >**をクリックします。

補足 5-1. アナライト濃度

測定サンプル濃度は、アナライト 5 段階以上の濃度シリーズ と“0（ゼロ）濃度の測定を推奨しています。また、測定中のリガンドの安定性確認のために“0（ゼロ）”以外で最低 1 濃度を 2 回測定することも推奨しています。このルールに従わない場合、**Next >**をクリックした時に推奨項目を列挙した画面が表示されます。

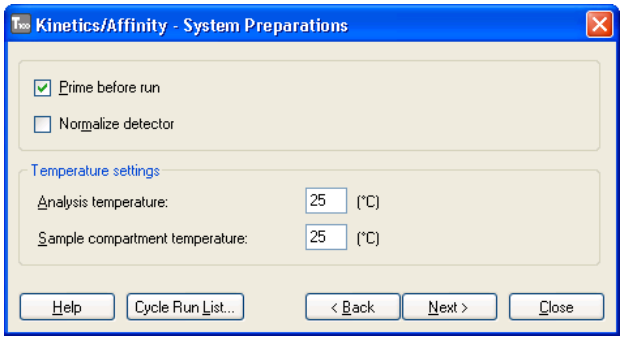


推奨を無視して測定する場合は、**Ignore** をクリックし次のステップに進んでください。

補足 5-2. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力することができます。

↓

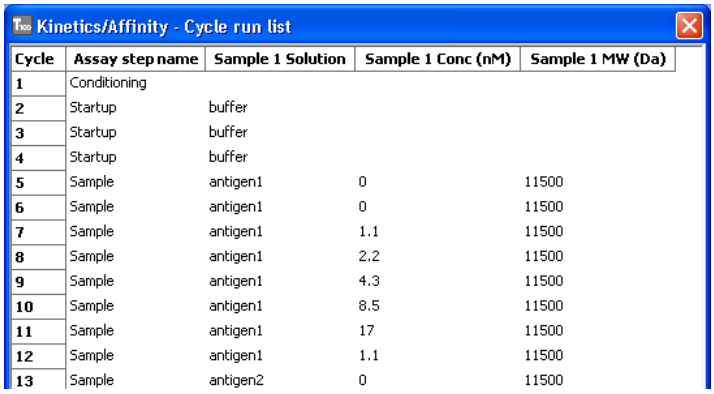


測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** を実施したい場合はチェックをします。

Temperature settings

Analysis temperature	25℃
Sample compartment temperature	25℃

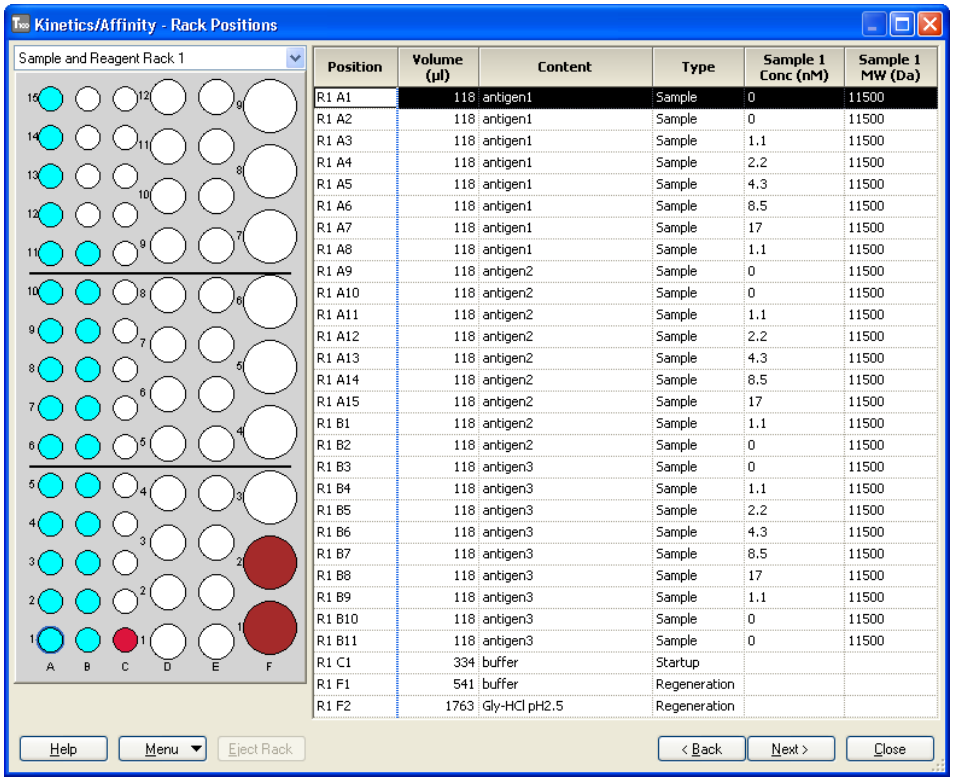
Cycle Run List...をクリックすると、測定サイクルの確認ができます。



Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (nM)	Sample 1 MW (Da)
1	Conditioning			
2	Startup	buffer		
3	Startup	buffer		
4	Startup	buffer		
5	Sample	antigen1	0	11500
6	Sample	antigen1	0	11500
7	Sample	antigen1	1.1	11500
8	Sample	antigen1	2.2	11500
9	Sample	antigen1	4.3	11500
10	Sample	antigen1	8.5	11500
11	Sample	antigen1	17	11500
12	Sample	antigen1	1.1	11500
13	Sample	antigen2	0	11500

Next >をクリックします。

↓



Position	Volume (µl)	Content	Type	Sample 1 Conc (nM)	Sample 1 MW (Da)
R1 A1	118	antigen1	Sample	0	11500
R1 A2	118	antigen1	Sample	0	11500
R1 A3	118	antigen1	Sample	1.1	11500
R1 A4	118	antigen1	Sample	2.2	11500
R1 A5	118	antigen1	Sample	4.3	11500
R1 A6	118	antigen1	Sample	8.5	11500
R1 A7	118	antigen1	Sample	17	11500
R1 A8	118	antigen1	Sample	1.1	11500
R1 A9	118	antigen2	Sample	0	11500
R1 A10	118	antigen2	Sample	0	11500
R1 A11	118	antigen2	Sample	1.1	11500
R1 A12	118	antigen2	Sample	2.2	11500
R1 A13	118	antigen2	Sample	4.3	11500
R1 A14	118	antigen2	Sample	8.5	11500
R1 A15	118	antigen2	Sample	17	11500
R1 B1	118	antigen2	Sample	1.1	11500
R1 B2	118	antigen2	Sample	0	11500
R1 B3	118	antigen3	Sample	0	11500
R1 B4	118	antigen3	Sample	1.1	11500
R1 B5	118	antigen3	Sample	2.2	11500
R1 B6	118	antigen3	Sample	4.3	11500
R1 B7	118	antigen3	Sample	8.5	11500
R1 B8	118	antigen3	Sample	17	11500
R1 B9	118	antigen3	Sample	1.1	11500
R1 B10	118	antigen3	Sample	0	11500
R1 B11	118	antigen3	Sample	0	11500
R1 C1	334	buffer	Startup		
R1 F1	541	buffer	Regeneration		
R1 F2	1763	Gly-HCl pH2.5	Regeneration		

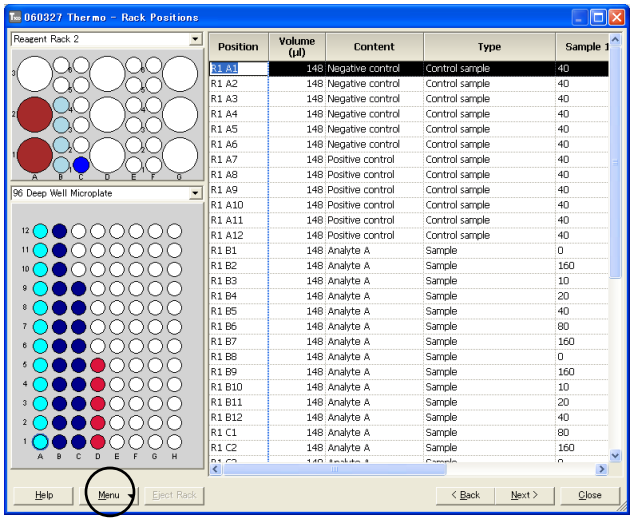
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 5-3. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

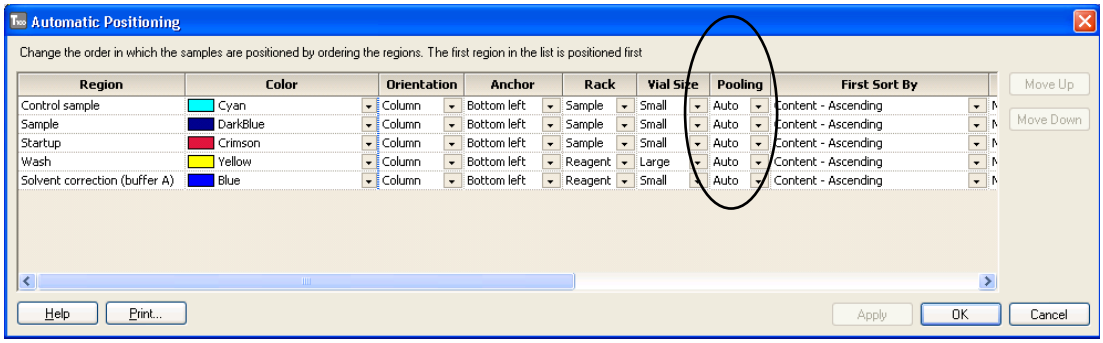
補足 5-4. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から **Automatic Positioning...**を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定が可能です。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっています。

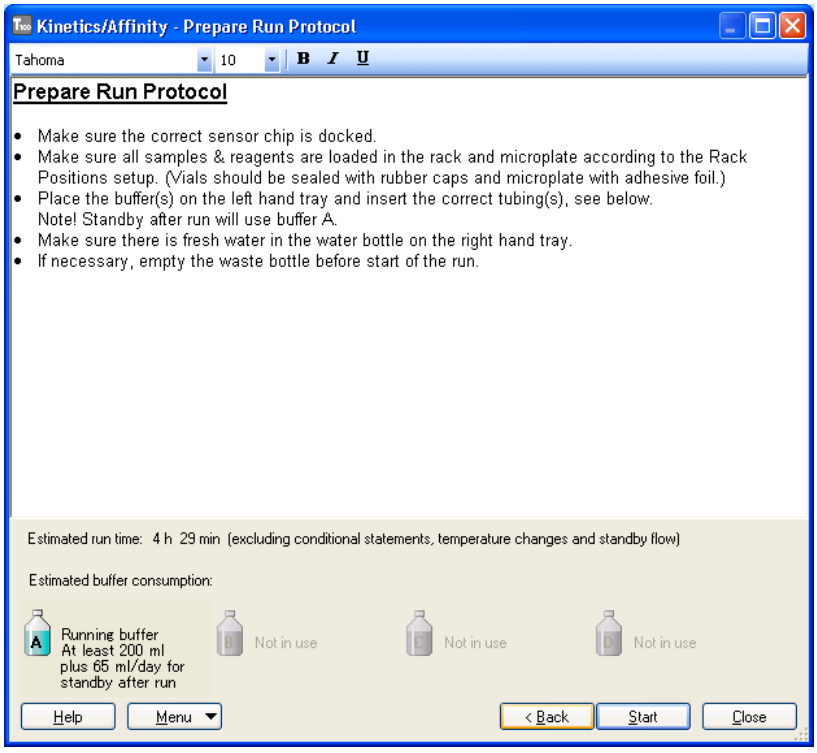
同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックします。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更してください。

↓

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開きます。
ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックします。

↓

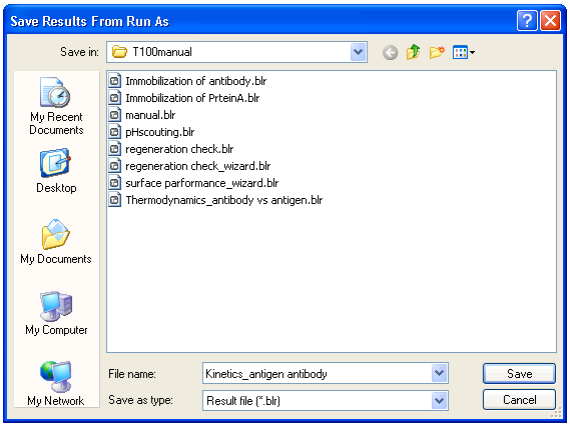

Kinetics/Affinity - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 4 h 29 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
A
Running buffer
At least 200 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
B
Not in use
C
Not in use
D
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、固定化時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** をクリックすると測定が開始されます。

↓

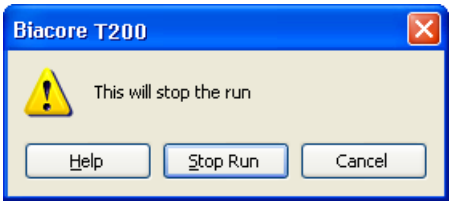
終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

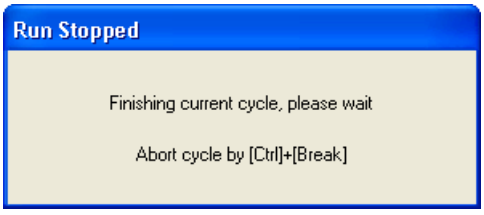
補足 5-5. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックします。



ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

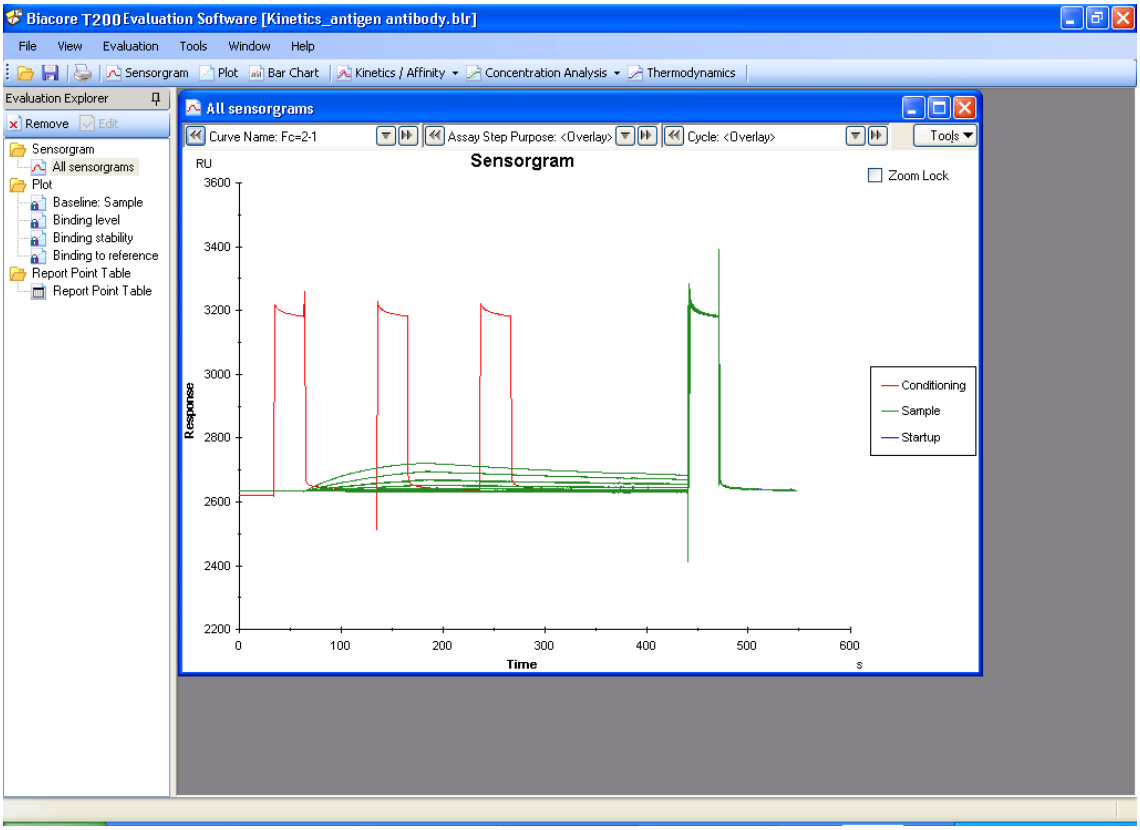
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行します。

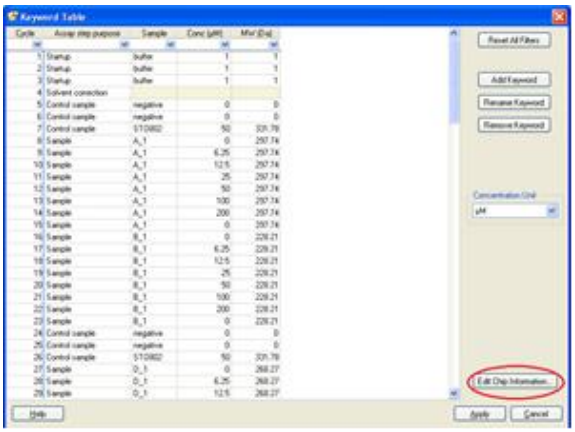
5-1-2. カーブフィッティングによる解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、自動保存された取得データが開きます。

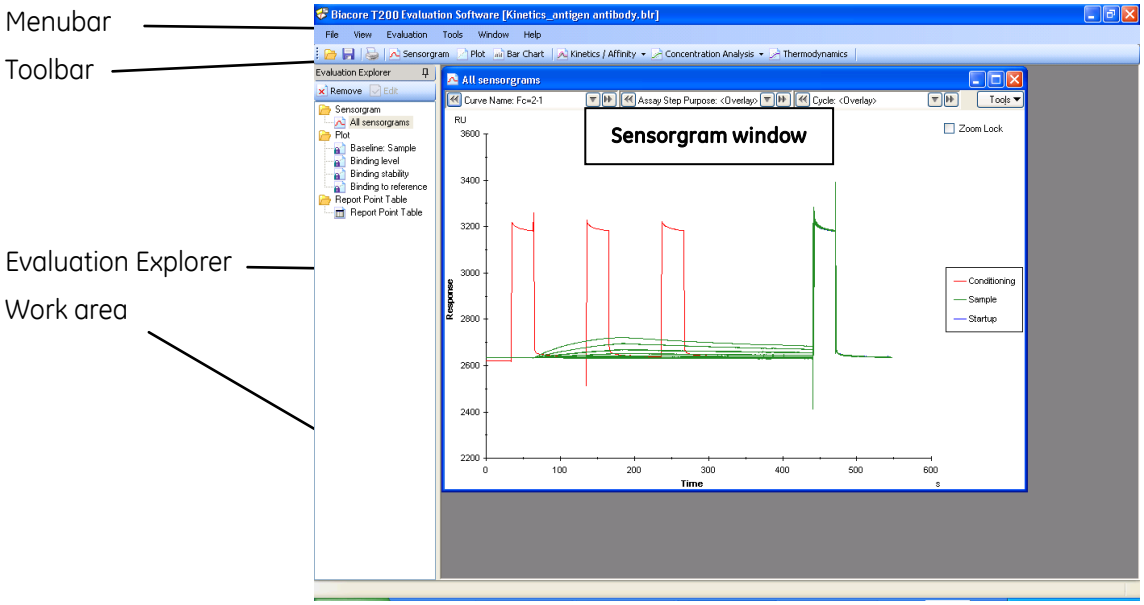


補足 5-6. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更します。**Tools... → Keyword Table...**をクリックします。リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。



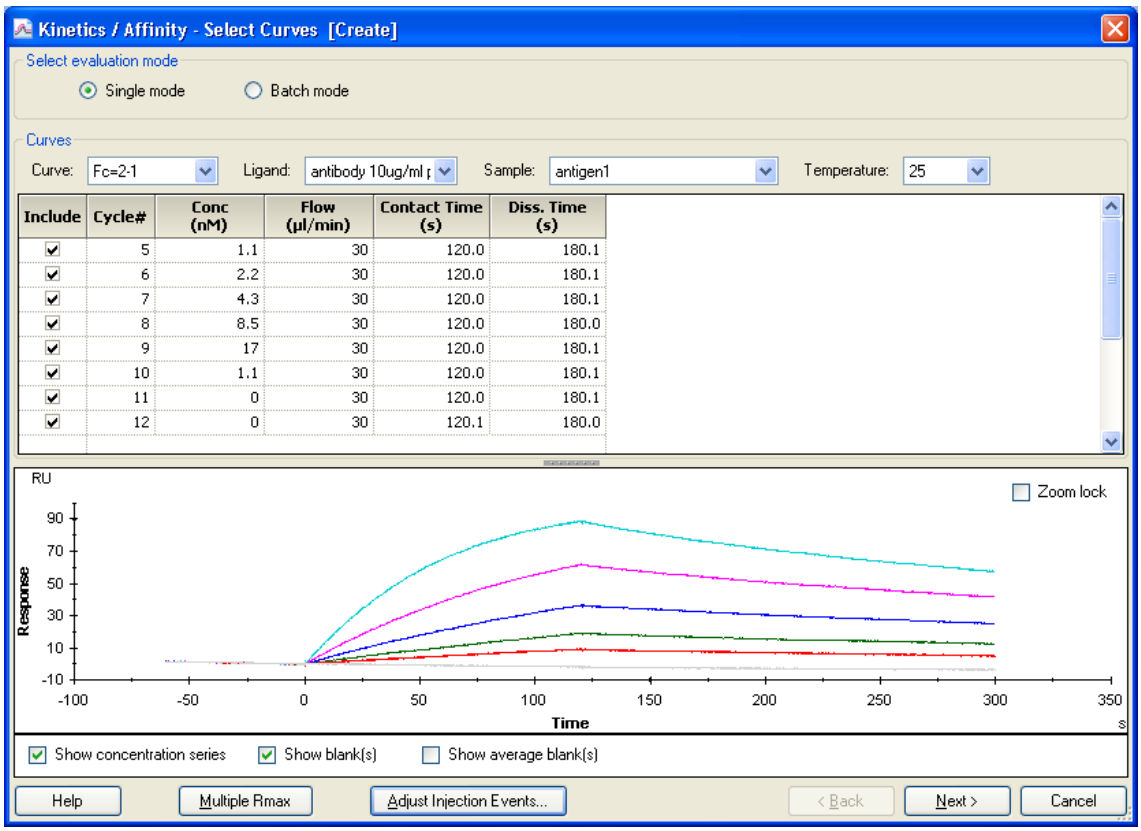
補足 5-7. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニューを表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリック後、Surface bound をクリックします。

↓



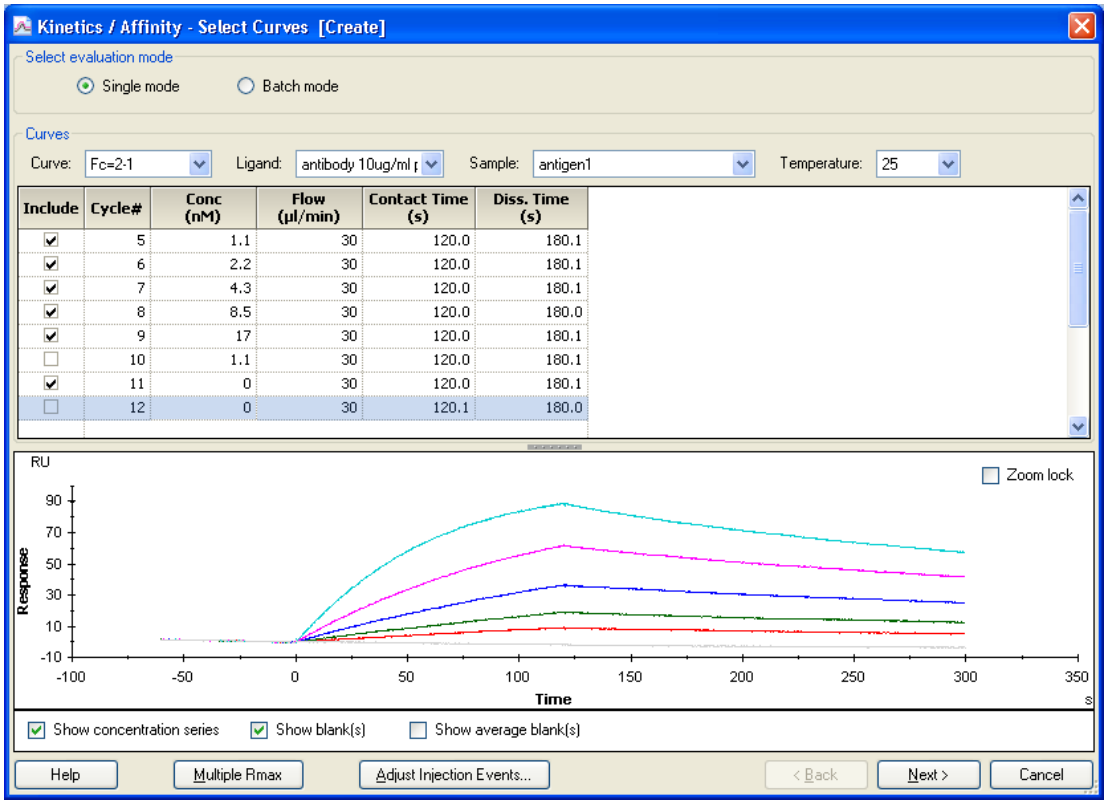
同一サンプル名のセンサーグラムがすべて重ね書き表示されます。

Select Evaluation mode で解析方法を選択します。1 サンプルごとに解析する場合には、**Single mode** を選択します。複数サンプルをバッチ解析する場合は、**Batch mode** を選択します。**Bath mode** については、補足 5-14 を参照してください。

複数のサンプルについて同時に測定している場合は、Sample:右側の をクリックすると、別サンプルのデータに移行できます。

ゼロ濃度のブランクサイクルを複数回測定している場合、センサーグラム下の **Show average blank（s）**にチェックを入れると、平均したセンサーグラムが表示されます。

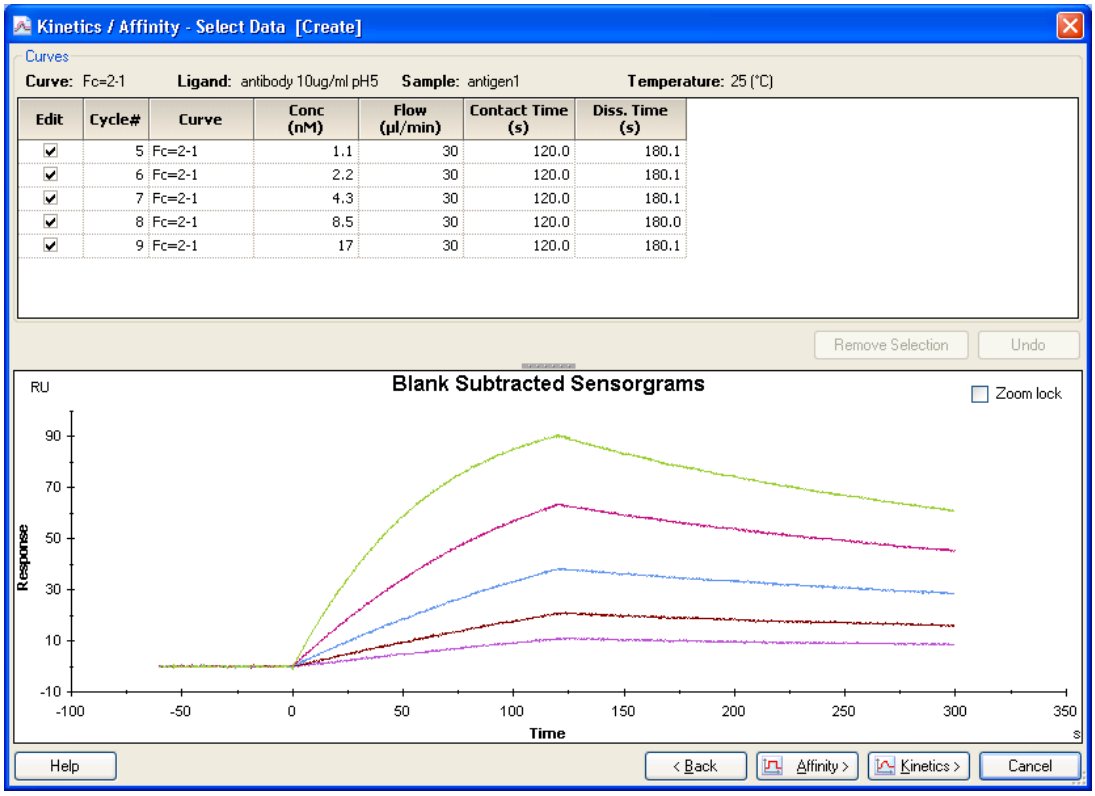
エアーの混入などの理由で、解析データから削除したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の Include カラムのチェックを外してください。



自動的にテーブル下のチャートから、チェックを外したセンサーグラムは消えます。

Next >をクリックします。

↓

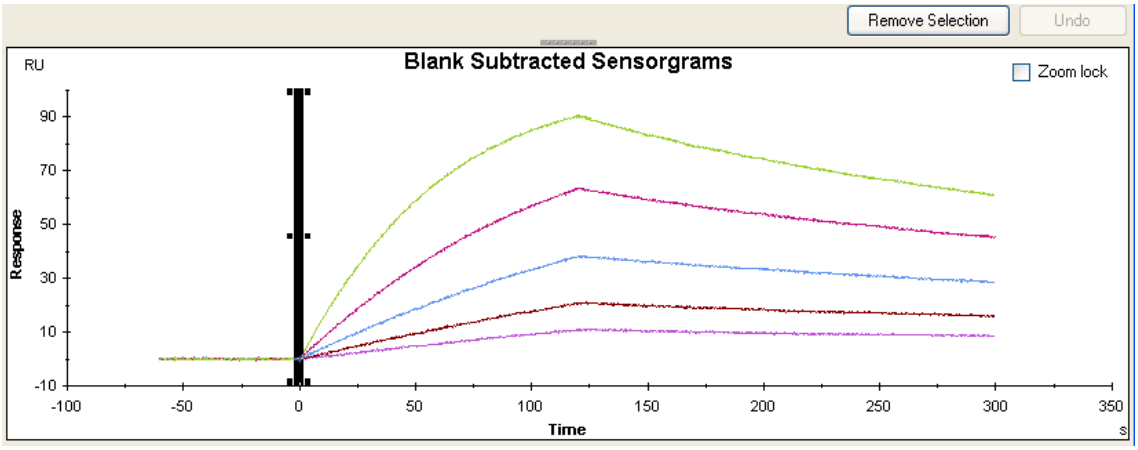


濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれます。
Kinetics >をクリックします。

↓

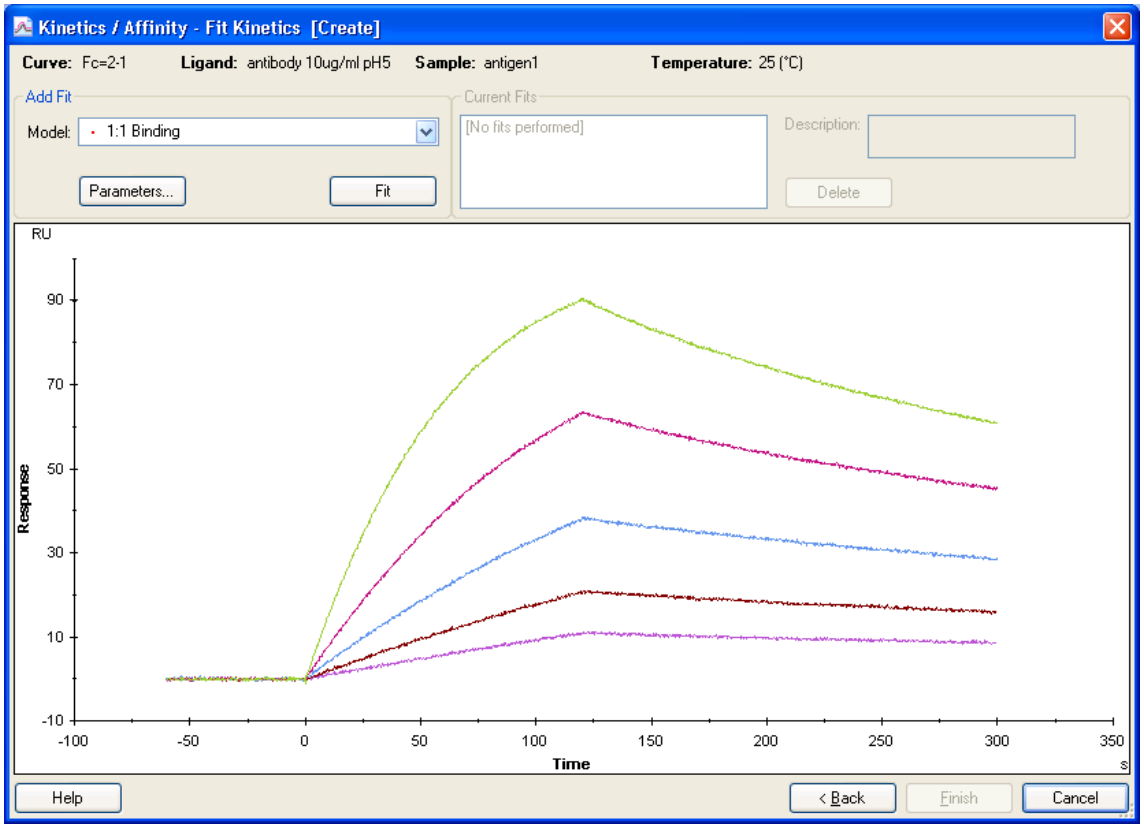
補足 5-8. センサーグラムの部分的削除

エアーの混入や添加開始・終了点のノイズなど、解析データの中から一部削除したい領域がある場合には、マウスの左ボタンをドラッグし該当の領域を拡大したのち、マウスの右ボタンをドラッグして削除する領域を選択します。拡大図を解除する場合は、センサーグラムを含まない余白をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻ります。

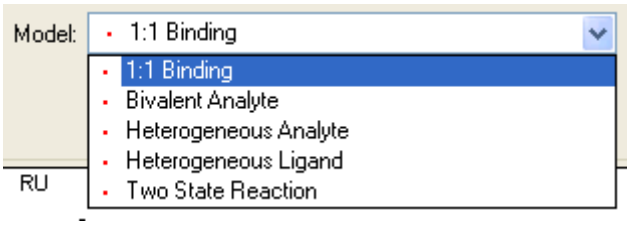


領域を選択すると、グラフの右上の **Remove Selection** ボタンがアクティブになります。ボタンをクリックすると選択部位が削除されます。

↓



Model:に、フィッティングに採用する反応モデル式を選択します。▼をクリックすると、すべての反応モデルが表示されます。反応モデルが不明な場合は、1:1 Binding を選択します。



選択後、**Fit** をクリックします。

↓

補足 5-9. 反応モデル

リガンドを B、アナライトを A とします。

1:1 Binding　　**A + B ⇔ AB**

リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合するもっとも単純な反応モデル。

Bivalent Analyte　　**A + B ⇔ AB , AB + B ⇔ AB2**

アナライトが 2 価もしくはホモ 2 量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が 2 次的に結合する反応。

Heterogeneous Analyte　　**A1 + B ⇔ A1B , A2 + B ⇔ A2B**

競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。

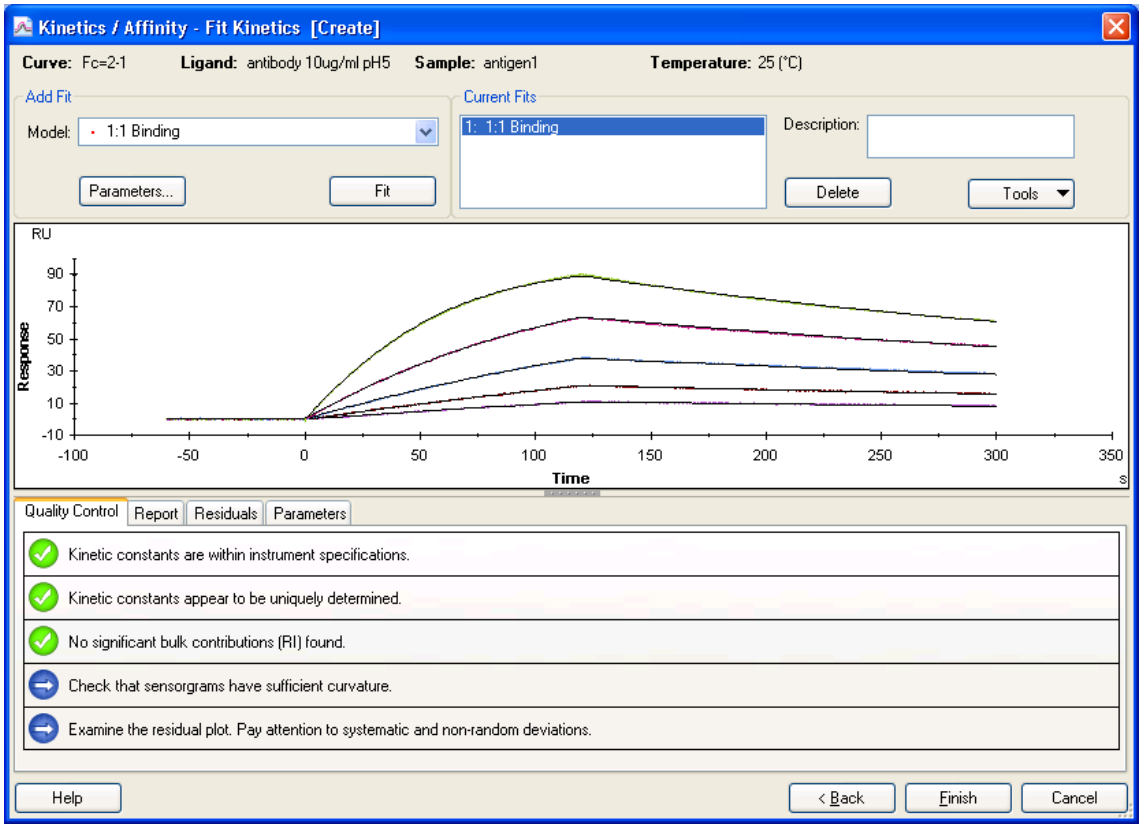
Heterogeneous Ligand　　**A + B1 ⇔ AB1 , A + B2 ⇔ AB2**

アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。

Two state Reaction　　**A + B ⇔ AB ⇔ AB***

リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

解析結果が表示されます。



黒色のセンサーグラムは、フィッティングにより得られたフィッティングカーブです。
既存の 1:1 Binding モデルで解析した場合には、**Quality Control** テーブルが表示され、解析結果の評価が表示されます。

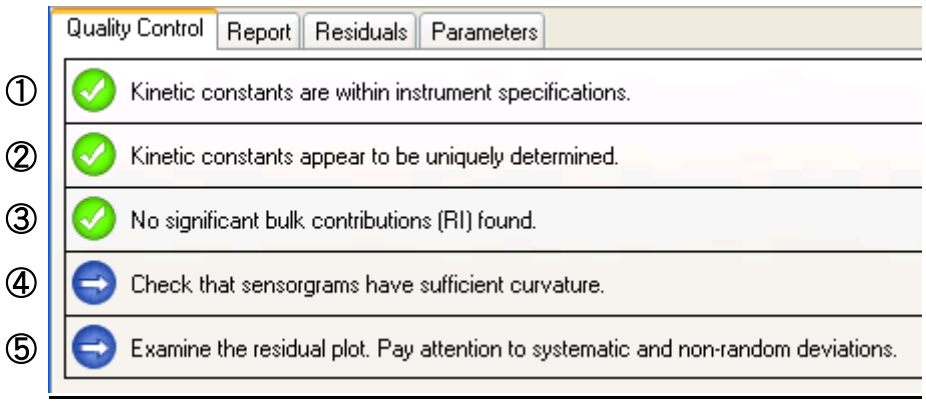
補足 5-10. 解析結果の Quality Control

5 項目の品質評価結果が、ステータスマークで表示されます。

ステータスマーク

- クオリティーアセスメントにパスしています。
- クオリティーアセスメントの許容限界に近いです。
- クオリティーアセスメントにパスしていません。
- ニュートラルまたは各自で確認します。

品質評価基準



①速度定数がシステムのスペック範囲内かどうかチェックしています。
スペックに近い場合や、超えている場合には、 が付きます。
スペック範囲　k_a = 10^3～10^7 (1/Ms)、k_d = 10^{-5}～0.5 (1/s)

②各パラメータが独立して算出されているかどうかチェックしています。
k_a、k_d および R_{max} について解析結果に与える、パラメータ間の相関性を確認しています。マストランスポートリミテーション下で測定した結果は、k_a、k_d に相関性が見られます。

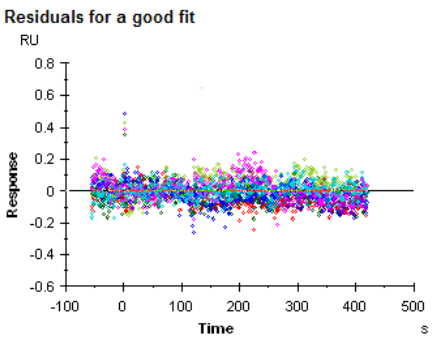
③溶液効果の値（RI）の妥当性をチェックしています。
リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引いている場合には、RI は限りなくゼロとなりますが、結合・解離速度が速くセンサーグラムが箱型の場合には、RI の値が大きく算出され、解析結果へ影響を与えます。

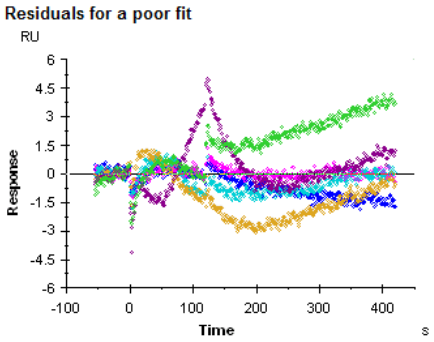
④センサーグラムがカーブを描いているかどうか、確認してください。

センサーグラムの結合・解離領域が直線的な場合、得られる解析結果の信頼性は低くなります。

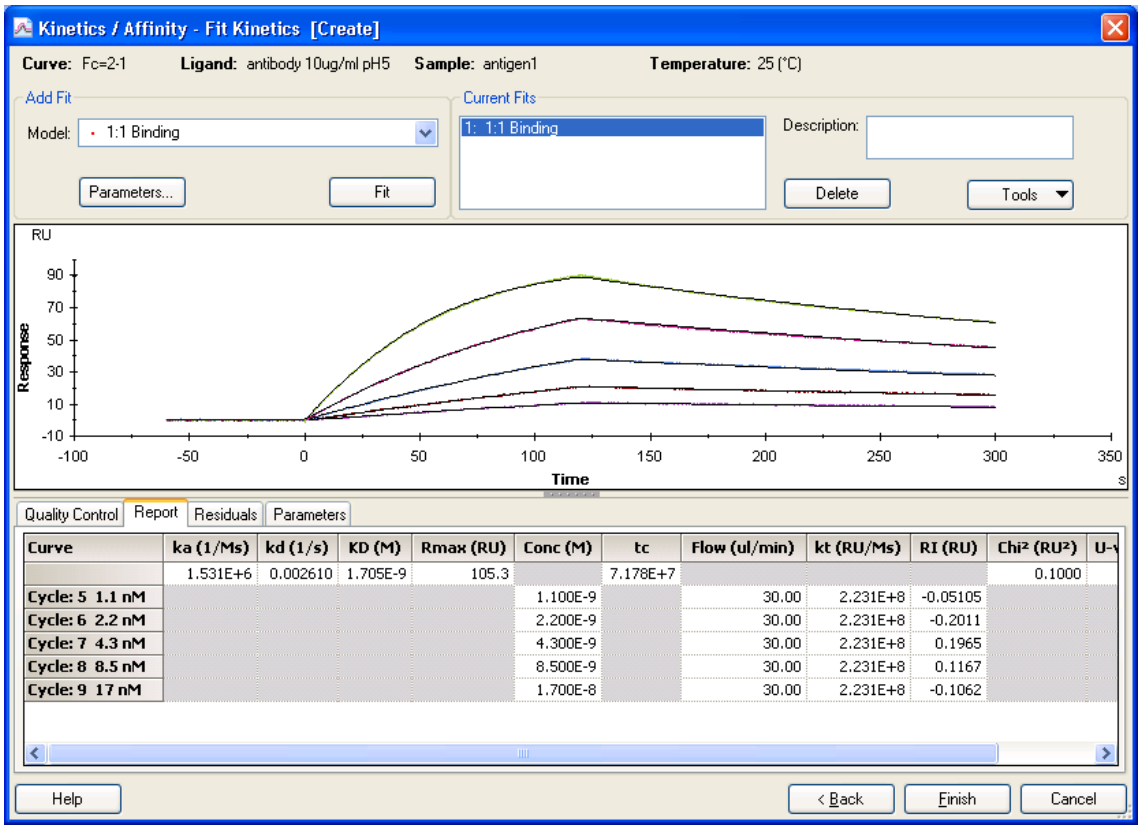
⑤フィッティングカーブに対して測定プロットがランダムに分散しているかどうか、確認してください。

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認します。Y 軸のゼロ近傍（目安：±1～2 RU）で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できます。緑色のガイドライン内にほとんどのプロットが入っていることを確認してください。





Report タブをクリックすると、算出された各種パラメータが表示されています。



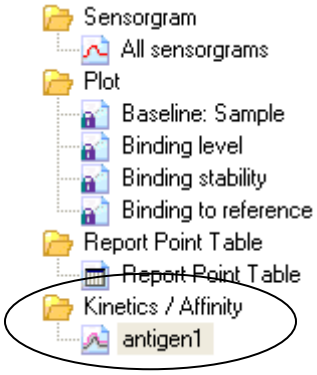
Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)
	1.531E+6	0.002610	1.705E-9	105.3		7.178E+7				0.1000
Cycle: 5 1.1 nM					1.100E-9		30.00	2.231E+8	-0.05105	
Cycle: 6 2.2 nM					2.200E-9		30.00	2.231E+8	-0.2011	
Cycle: 7 4.3 nM					4.300E-9		30.00	2.231E+8	0.1965	
Cycle: 8 8.5 nM					8.500E-9		30.00	2.231E+8	0.1167	
Cycle: 9 17 nM					1.700E-8		30.00	2.231E+8	-0.1062	

k_a （1/Ms）	結合速度定数
k_d （1/s）	解離速度定数
K_D （M）	解離定数
R_{max}（RU）	アナライトの最大結合量
RI （RU）	溶液効果（bulk effect）
Chi^2 （RU^2）	カイ二乗
U-value	U-バリュー（既存の 1:1 Binding モデル使用時のみ）

Finish をクリックします。

↓

上記解析結果は、画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダに追加されます。ファイル名にはサンプル名が自動的に入力されます。



引き続き、同時に測定した別のサンプルについて解析する場合は、Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックします。

補足 5-11. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られたフィッティングカーブがほぼ重なります。センサーグラムの傾きが大きく異なる場合、フィッティングは良好ではないと判断します。また、解析結果の RI 値が 0（RU）に近いか確認します。統計学的に、以下の各項目を確認します。

Residual

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認します。Y 軸のゼロ近傍（目安：±1～2 RU）で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できます。緑色のガイドライン内にほとんどのプロットが入っていることを確認してください。

Chi²

測定データとフィッティングカーブ間の差を示します。良好なフィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致します。

U-value

解析値が信頼できるか否かを判断する値です。15 以下であれば問題ありません。25 以上になると、算出された値の信頼性は低くなります。

SE （Standard error）

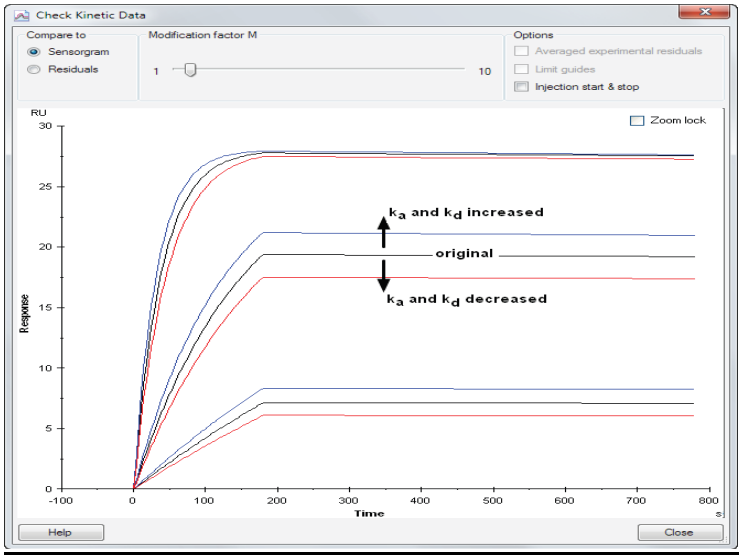
各パラメータについて SE（標準誤差）が表示されます。各パラメータの解析結果に対して、SE の値が 10%以下であれば問題ありません。

Check Kinetic Data

解析ウインドウ右上の Tools にあります。マストランスポートリミテーションの影の強さを確認します。

ウインドウ上の Modification factor M のスライダーを 1 から 10 まで移動します。この際、解析結果の黒色のセンサーグラムに対して、赤色と青色のセンサーグラ

ムの変化を確認します。赤色と青色のセンサーグラムは、黒色のセンサーグラムの k_a、k_d 値をそれぞれ 1～10 倍変化させて得られるセンサーグラムです。変化が小さい場合には、マストランスポートリミテーションの影響が強いと判断します。



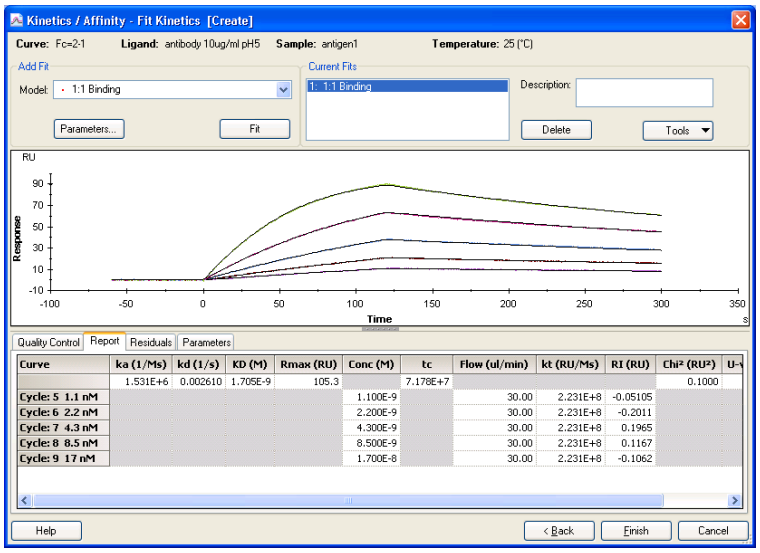
フィッティングが良好ではない要因

①フィッティングに採用したモデルが異なっている
②箱型のセンサーグラムである
③経時的なリガンドの活性低下が考えられる
④再生が不十分である
⑤アナライト濃度の調製ミスが考えられる　など

①が要因と考えられる場合は、再度妥当な反応モデルを選択し解析してください。
②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になることがあります。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうからです。この場合は、RI=0 （Constant）として再解析してください。
複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセンサーグラムにおいて k_a, k_d, R_{max} が同一のパラメータであることが前提となります。しかし、上記③～⑤の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメータは必ずしも一致しません。
例えば、R_{max} は、リガンドに対するアナライトの最大結合量（RU）であり、理想的な実験系では、連続して同一セルを使用している限り、どの濃度のセンサーグラムに対しても同一値となります。ところが、リガンドの再生が不十分な場合や、再生操作によりリガンドの活性がサイクルごとに低下している場合には、R_{max} はサイクルごとに低下します。フィッティングが良好でない要因が、測定結果から明らかに R_{max} にある場合は、R_{max} が同一パラメータであることを解除し再解析してください。

補足 5-12. カーブフィッティングにおける再解析

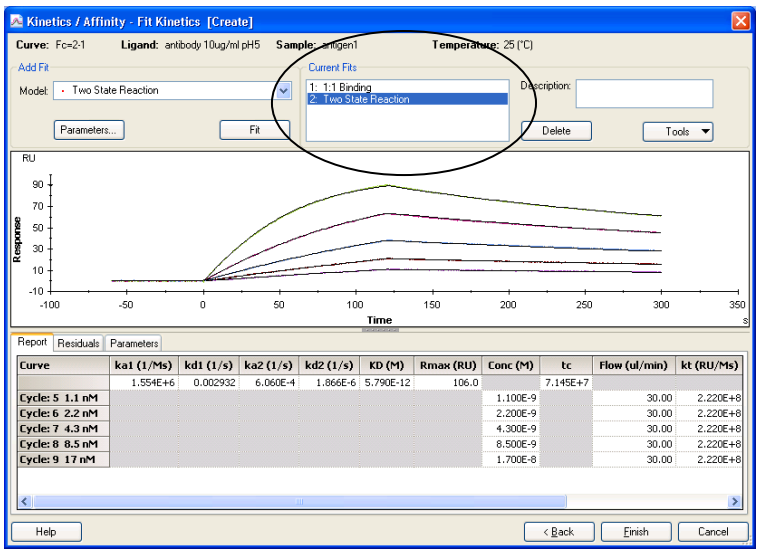
反応モデルの変更



反応モデルを変更し再解析する場合は、**Finish** をクリックせず、**Add Fit** ボックスの **Model:** 右側の ▼ をクリックし、新しい反応モデルを選択します。**Fit** をクリックします。

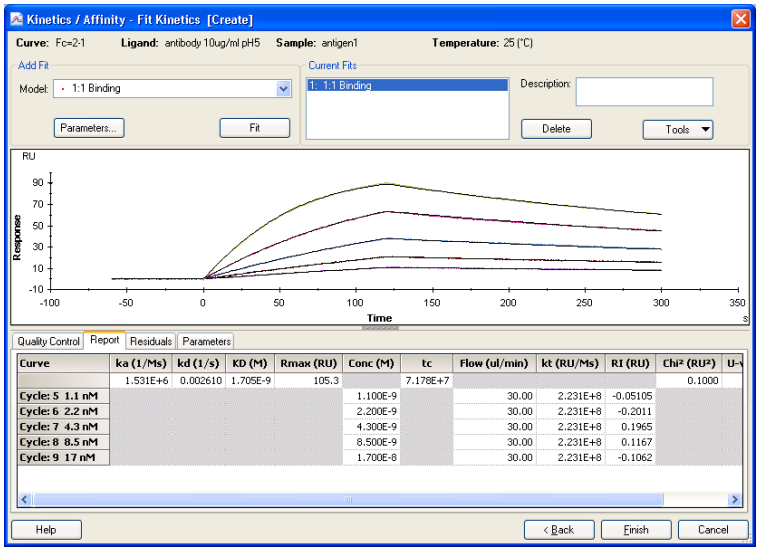
↓

新しい解析結果が表示されます。



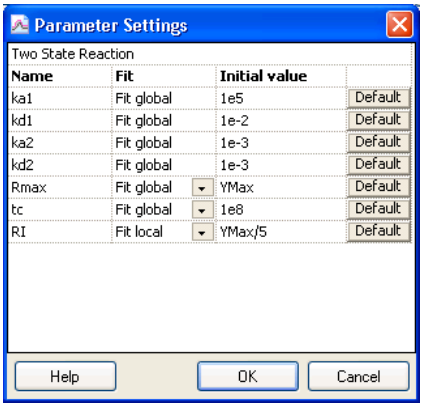
解析したすべての結果は、履歴として、**Current Fits** ボックスに残ります。
前の解析結果を見る場合は、**Current Fits** ボックスの目的の反応モデルをクリックすると結果が表示されます。終了後、**Finish** をクリックします。

解析パラメータの解析設定条件の変更



解析パラメータ（R_{max} ,RI）の解析設定条件を変更し再解析する場合は、**Add Fit** ボックスの **Parameters** をクリックします。

↓



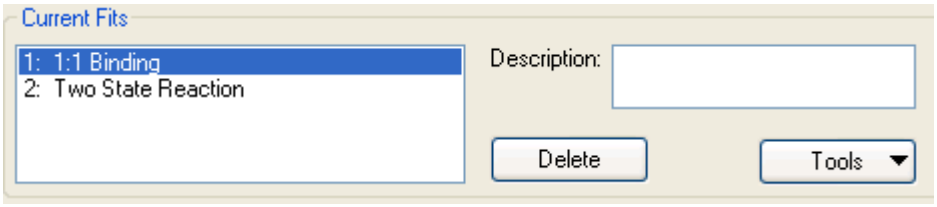
経時的なリガンドの活性低下や再生の不十分さが原因で、全センサーグラムにおいて、R_{max} を同一パラメータとみなせない場合、R_{max} の行の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Fit local** を選択します。

箱型のセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているにもかかわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI としてみなしてしまう場合、RI の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Constant** を選択します。Initial value は自動的に 0 が入力されます。

Parameter Setting ダイアログ中の **OK** をクリックすると、条件が適用されます。
引き続き、**Fit** をクリックすると解析結果が表示されます。

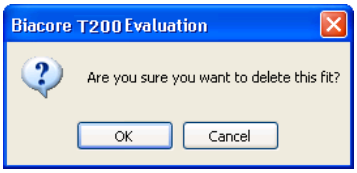
補足 5-13. 解析履歴からの結果の消去

解析結果を履歴から消去する場合は、**Current Fits** ボックス中の目的のデータを選択します。



Delete をクリックします。

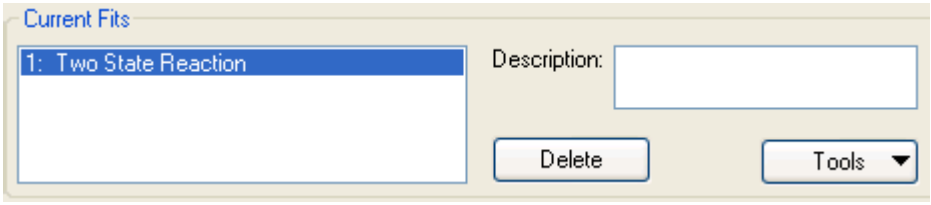
↓



確認ダイアログが表示されます。

消去する場合は **OK** をクリックします。

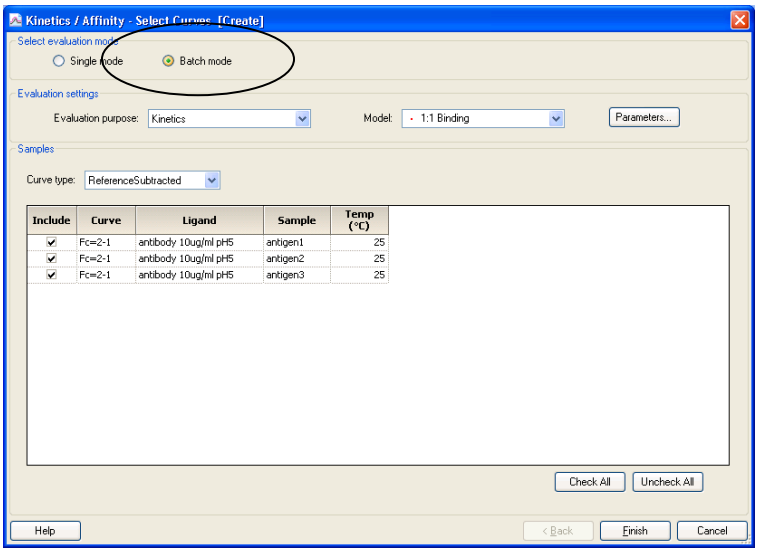
↓



解析結果が消去されます。

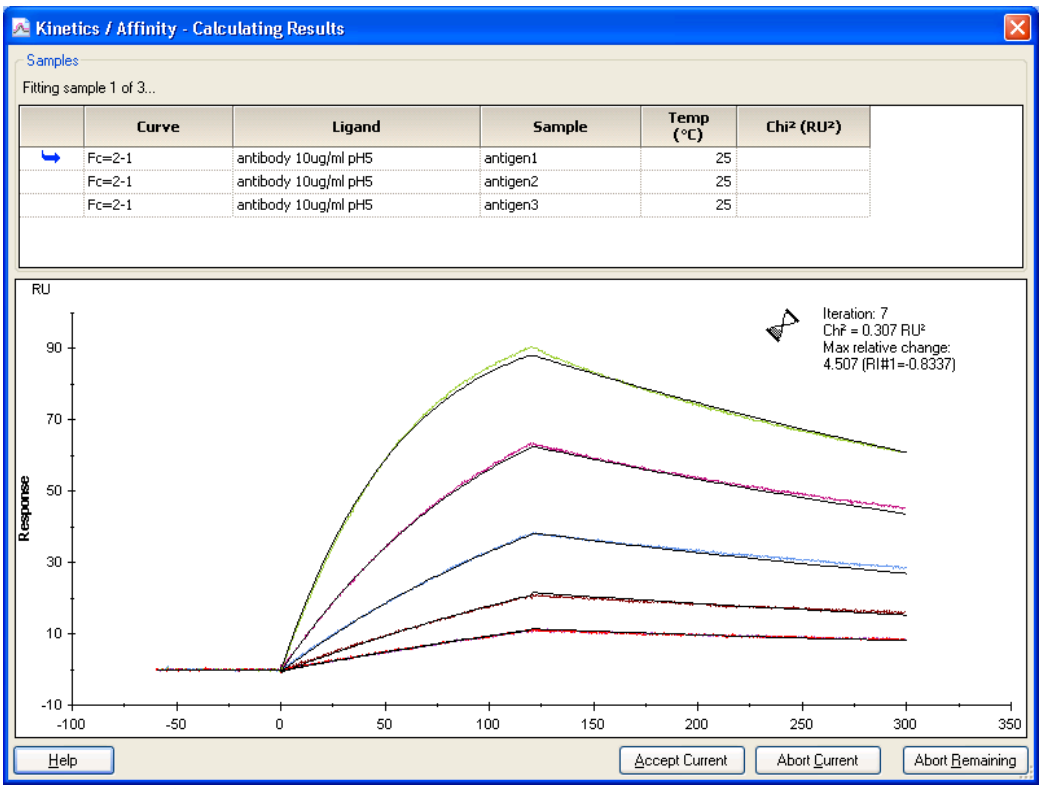
補足 5-14. Batch mode による解析方法

複数のサンプルについて同時に解析したい場合には、**Select Evaluation mode** で、**Batch mode** を選択します。なお、**Batch mode** では、各サンプルについて解析に利用するセンサーグラムの選択はできません。

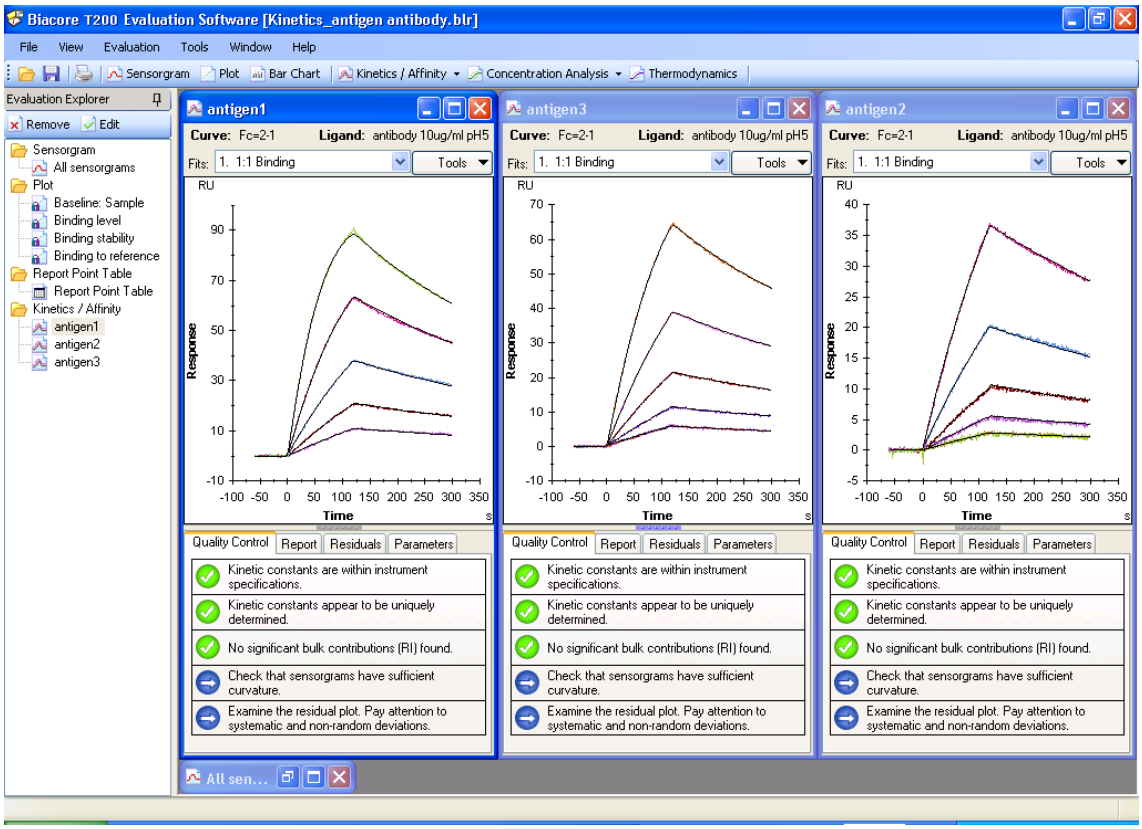


Samples に測定サンプルの一覧が表示されます。**Evaluation purpose** と **Model** を選択します。解析するサンプルにチェックを入れます。

↓



それぞれのサンプルについて解析が開始されます。



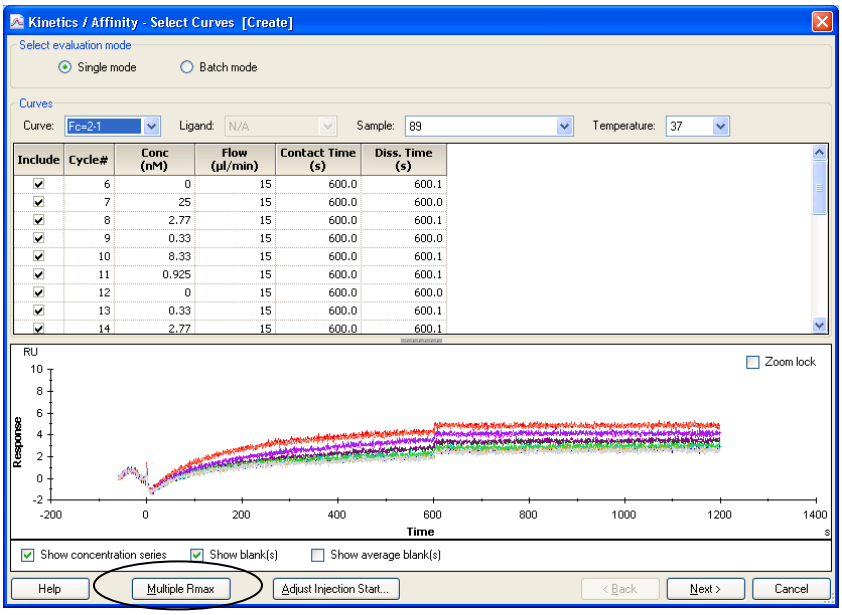
解析結果が表示されます。

各ウインドウを並べて表示させたい場合には、ツールバーの **Window > Tile Horizontally** または **Tile Vertically** を選択します。

画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダにそれぞれの解析結果が追加されます。ファイル名にはサンプル名が自動的に入力されます。

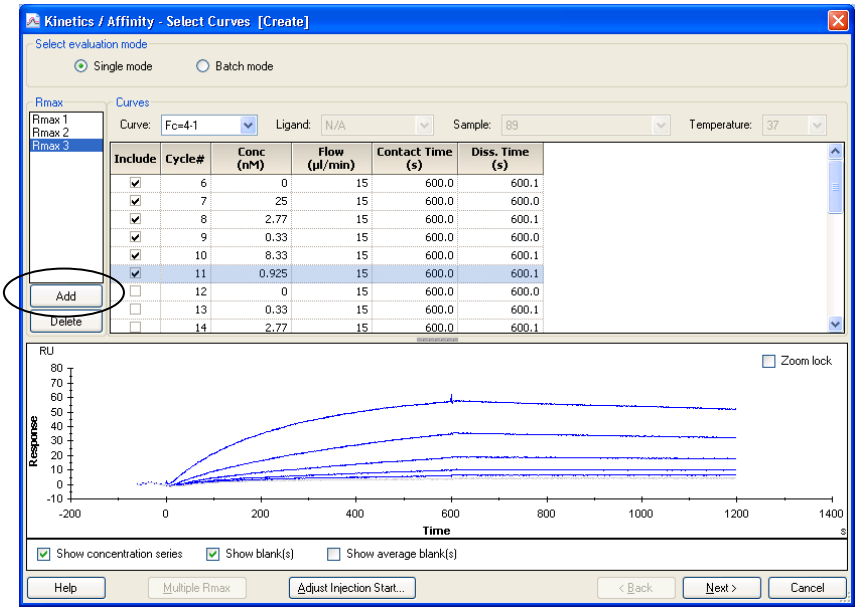
補足 5-15. Multiple R_{max} を用いた解析方法

同一サンプルにおいて、固定化量が異なるセンサーグラムを同時に解析して、1 つの解析結果を算出することができます。解析に利用するセンサーグラムは、同一温度で測定した、同一濃度系列のものを利用してください。



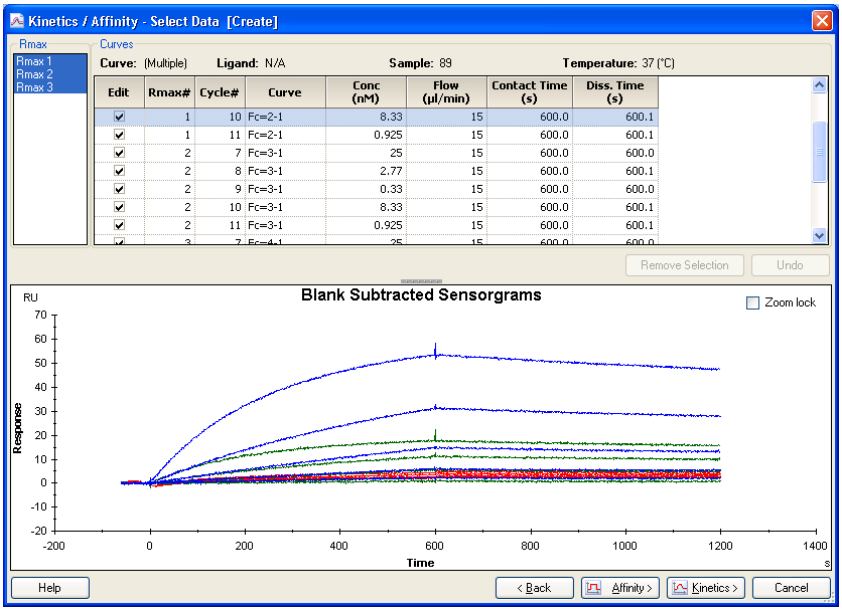
Select Curves [Create]ウインドウで、サンプルを選択後、**Multiple R_{max}** をクリックします。

↓



Curve でセンサーグラムを選択し、**Add** をクリックすると、解析に利用するセンサーグラムがウインドウ左上の **R_{max}** の一覧に追加されます。最大 5 つまで追加可能です。
ウインドウ右上の **Curves** の **Include** で解析に持ち込むセンサーグラムを選択します。
Next >をクリックします。

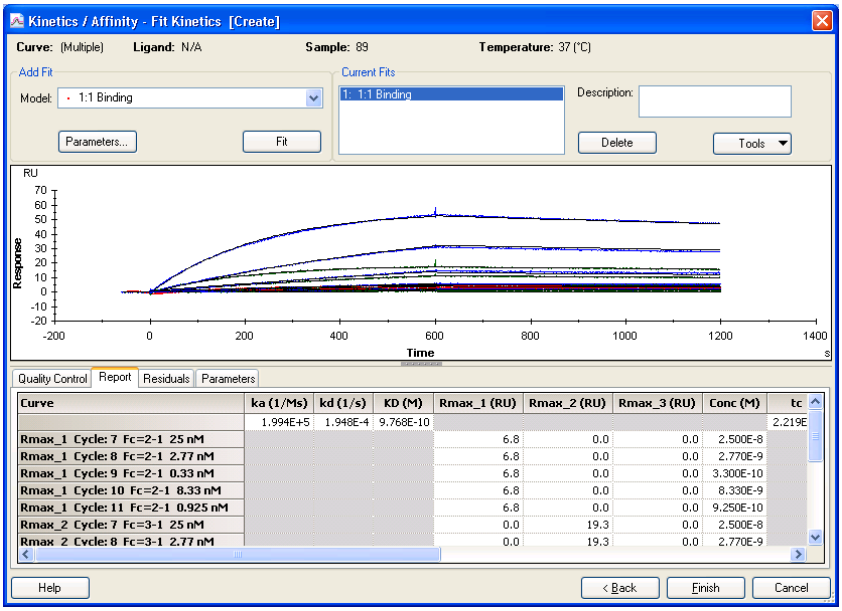
↓



Kinetics >をクリックします。

↓

モデルを選択後、**Fit** をクリックします。



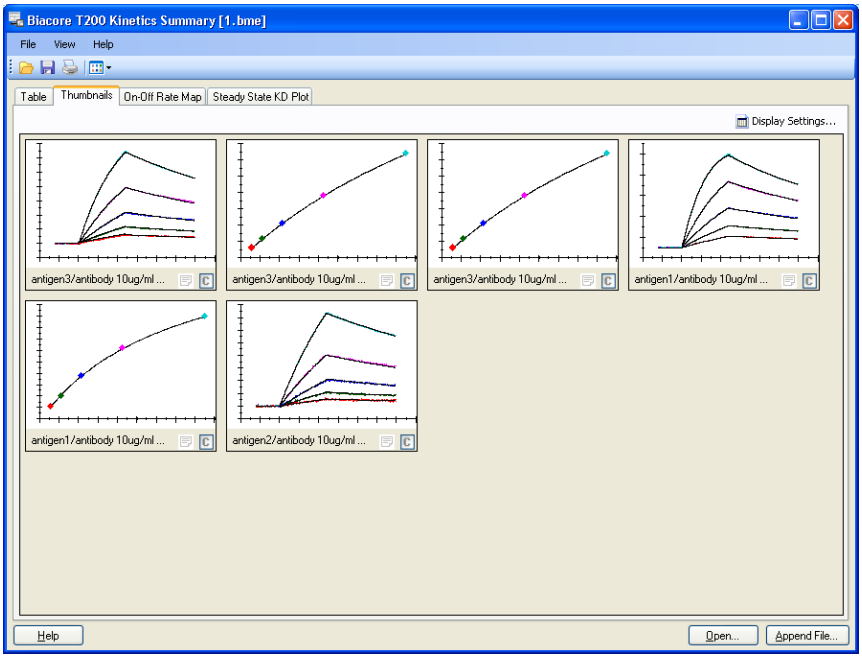
解析結果が表示されます。

R_{max} は固定化量ごとに、Fit global で算出されます。

補足 5-16. 反応速度定数、解離定数のマッピング

Kinetics Summary を使用することで、各サンプルの解析結果の反応速度定数を、Y 軸=k_a、X 軸=k_d のチャートに自動マッピングすることができます。また、Affinity 解析で得られた解離定数は、別途、Y 軸=K_D、X 軸=サンプルのチャートを作成できます。Biacore T200 Kinetics Summary にデータを持ち込む場合には、事前に解析データを保存しておく必要があります。別の解析データファイルの結果も同時にプロットしたい場合には、**Append File...**または **File → Append File...**をクリックして、該当の解析データを読み込みます。

Tools → Kinetics Summary をクリックします。Biacore T200 Kinetics Summary が起動し、**Thumbnails** に、解析ソフトウェアで解析したすべての結果が読み込まれます。

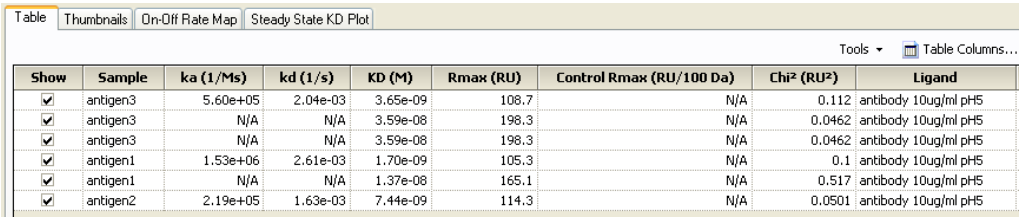


表示方法は、アイコン： の Small Thumbnails、Standard Thumbnails、Extended Thumbnails から選択できます。また、各サンプルのセンサーグラム上でダブルクリックをすると、解析結果ウインドウが開き、解析結果の詳細を確認できます。

センサーグラムを画像として一括保存したい場合には、File > Save as でファイルを保存後、Thumbnails 画面上で、マウス右クリック後、**Export All Graphs And Table** を選択して保存先を指定してください。または、マウス右クリック後、**Copy** の **Copy All Graphs** または **Copy All Thumbnails** を選択して Paint または WordPad に画像を貼り付けて保存してください。

↓

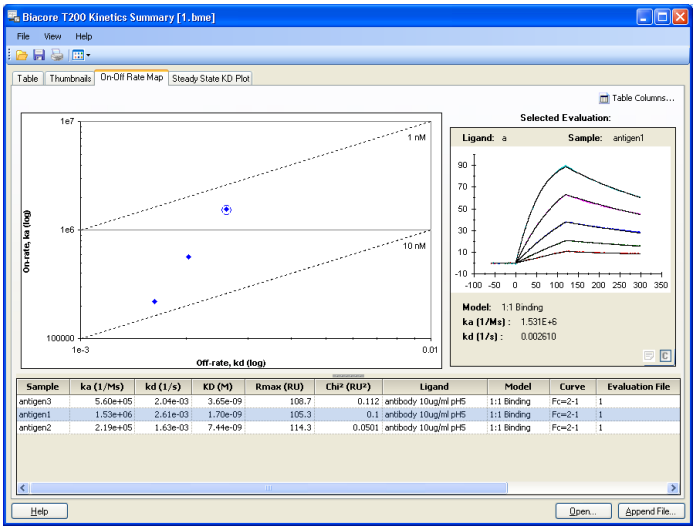
Table タブをクリックして、**Include** をチェックし、プロットするデータを選択します。



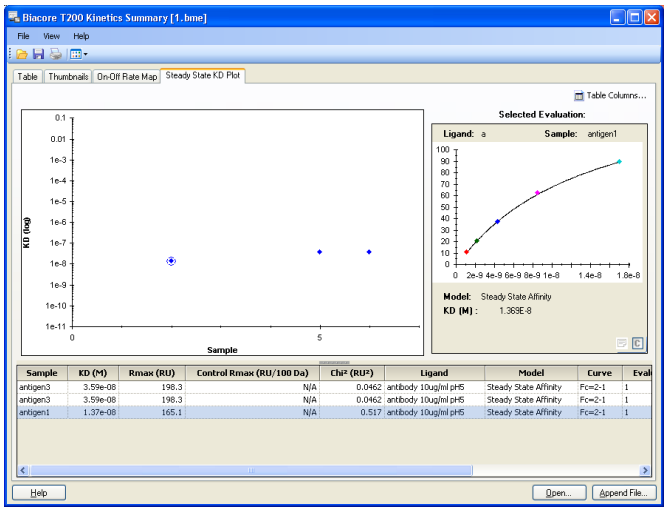
Show	Sample	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Control Rmax (RU/100 Da)	Chi² (RU²)	Ligand
☑	antigen3	5.60e+05	2.04e-03	3.65e-09	108.7	N/A	0.112	antibody 10ug/ml pH5
☑	antigen3	N/A	N/A	3.59e-08	198.3	N/A	0.0462	antibody 10ug/ml pH5
☑	antigen3	N/A	N/A	3.59e-08	198.3	N/A	0.0462	antibody 10ug/ml pH5
☑	antigen1	1.53e+06	2.61e-03	1.70e-09	105.3	N/A	0.1	antibody 10ug/ml pH5
☑	antigen1	N/A	N/A	1.37e-08	165.1	N/A	0.517	antibody 10ug/ml pH5
☑	antigen2	2.19e+05	1.63e-03	7.44e-09	114.3	N/A	0.0501	antibody 10ug/ml pH5

↓

On-Off Rate Map タブをクリックします。k_d vs k_d プロットが表示されます。



ポイントをクリックすると、画面右に該当するセンサーグラムが表示されます。



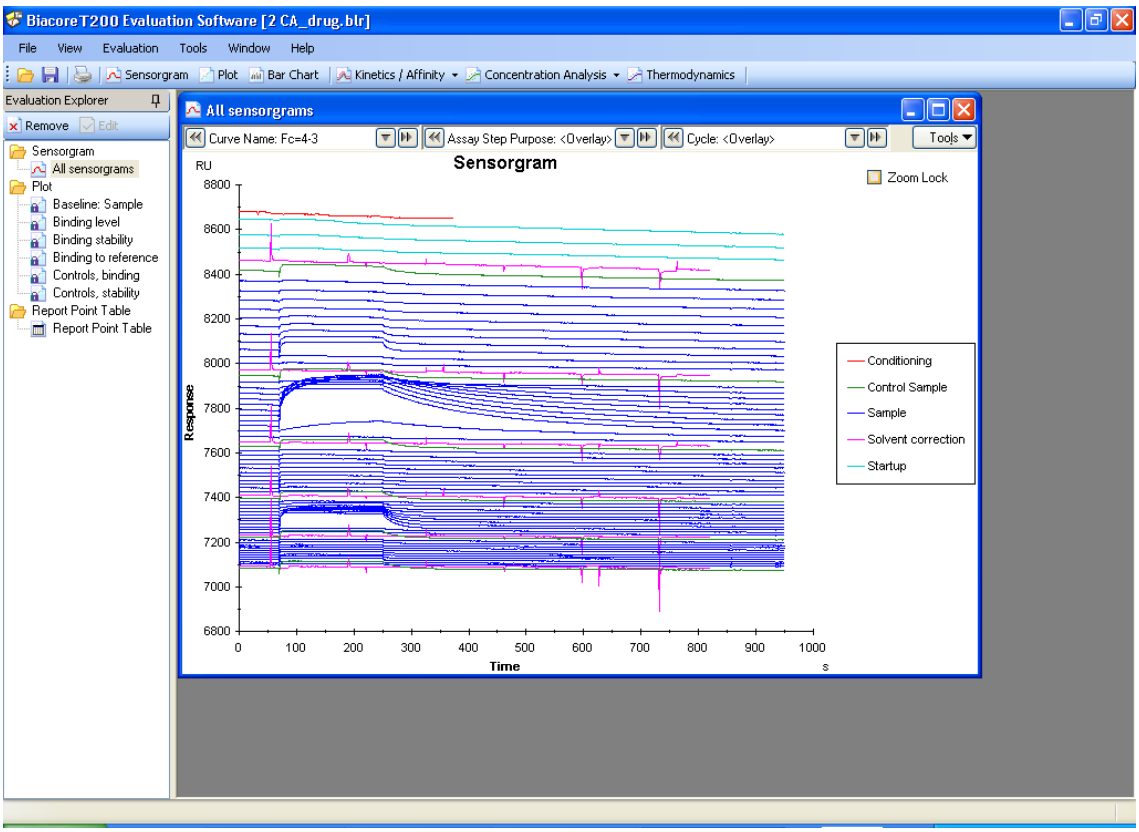
Steady State KD Plot タブをクリックします。K_D vs Sample のプロットが表示されます。

(Affinity 解析で得られた K_D のみプロットします。)

プロットを画像として保存したい場合には、マウス右クリック後、Copy Graph を選択して Paint または WordPad に画像を貼り付けて保存してください。

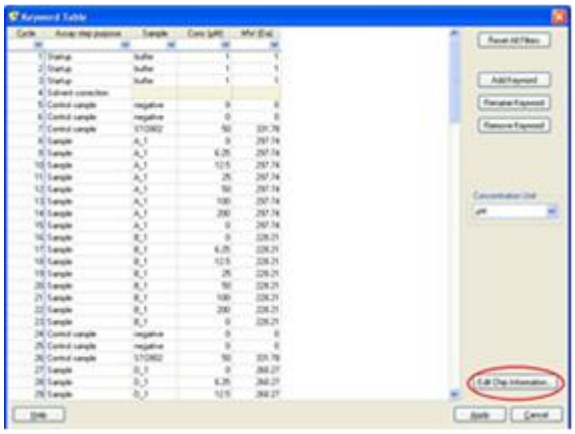
5-1-3. 平衡値解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行されます。



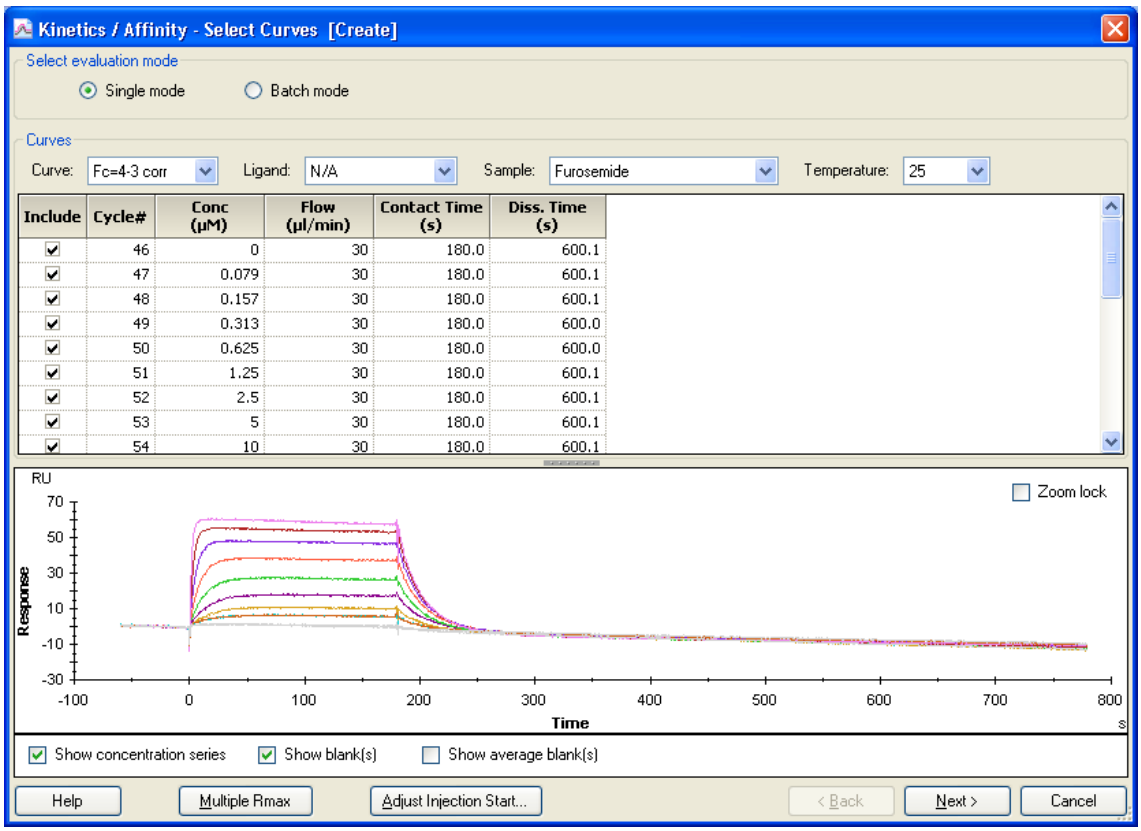
補足 5-17. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更します。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックします。リガンド名の変更は、右下の Edit Chip Information をクリックして変更します。



Toolbar の Kinetics / Affinity をクリック後、 Surface bound をクリックします。

↓



同一サンプル名のセンサーグラムが重ね書き表示されます。

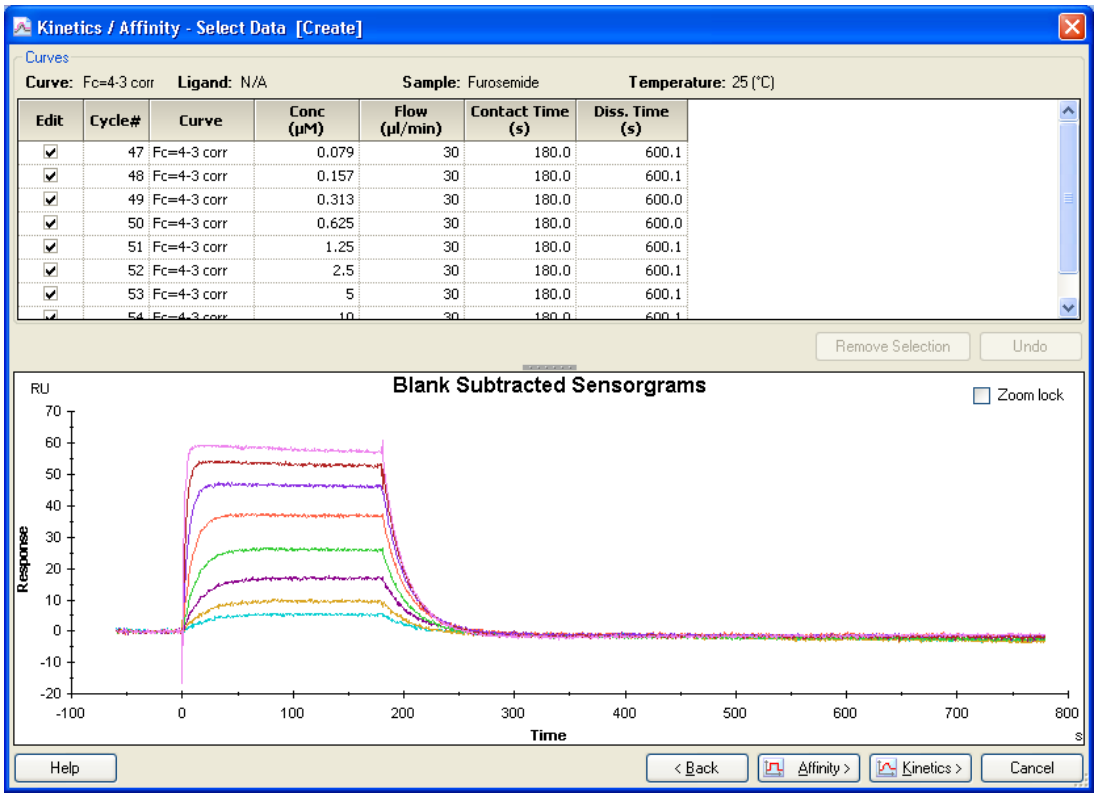
Select Evaluation mode で解析方法を選択します。1 サンプルごとに解析する場合には、**Single mode** を選択します。複数サンプルをバッチ解析する場合は、**Batch mode** を選択します。**Bath mode** については、補足 5-14 を参照してください。

複数のサンプルについて同時測定している場合は、Sample:右側の をクリックすると、別サンプルのデータに移行できます。

ゼロ濃度のブランクサイクルを複数回測定している場合、センサーグラム下の **Show average blank（s）**にチェックを入れると、平均したセンサーグラムが表示されます。

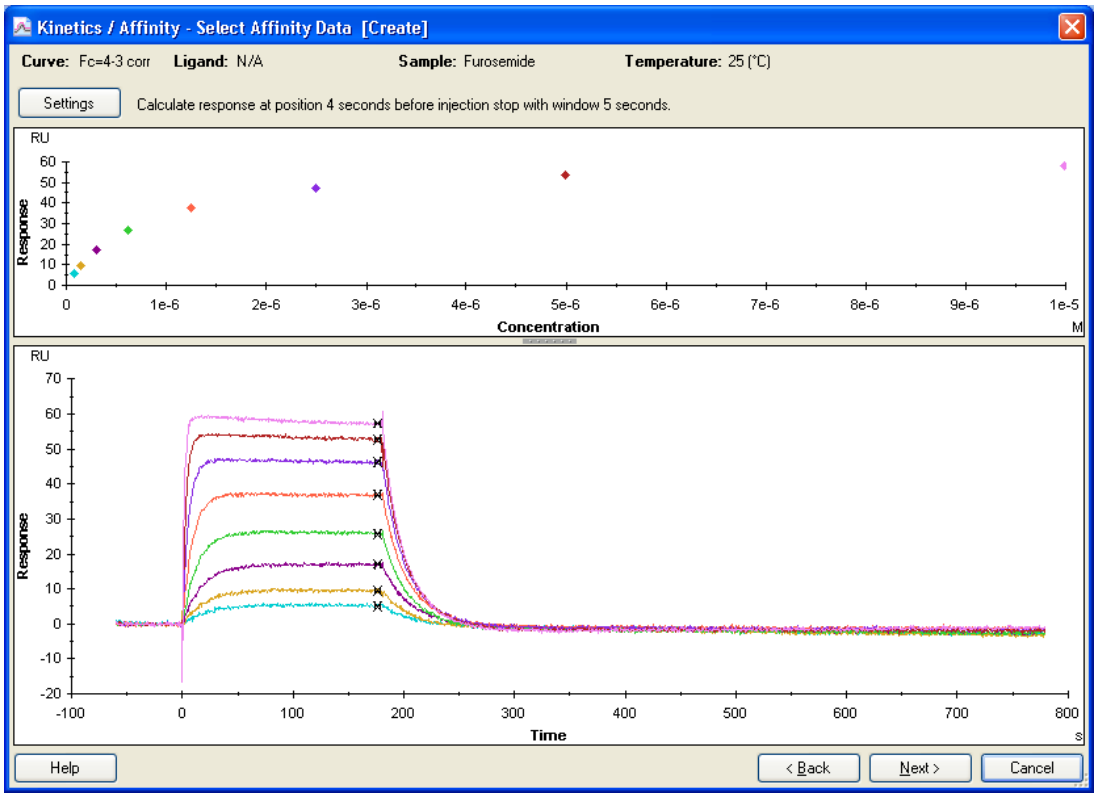
エアーの混入などの理由で、解析データから削除したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の Include カラムのチェックを外します。
Next >をクリックします。

↓



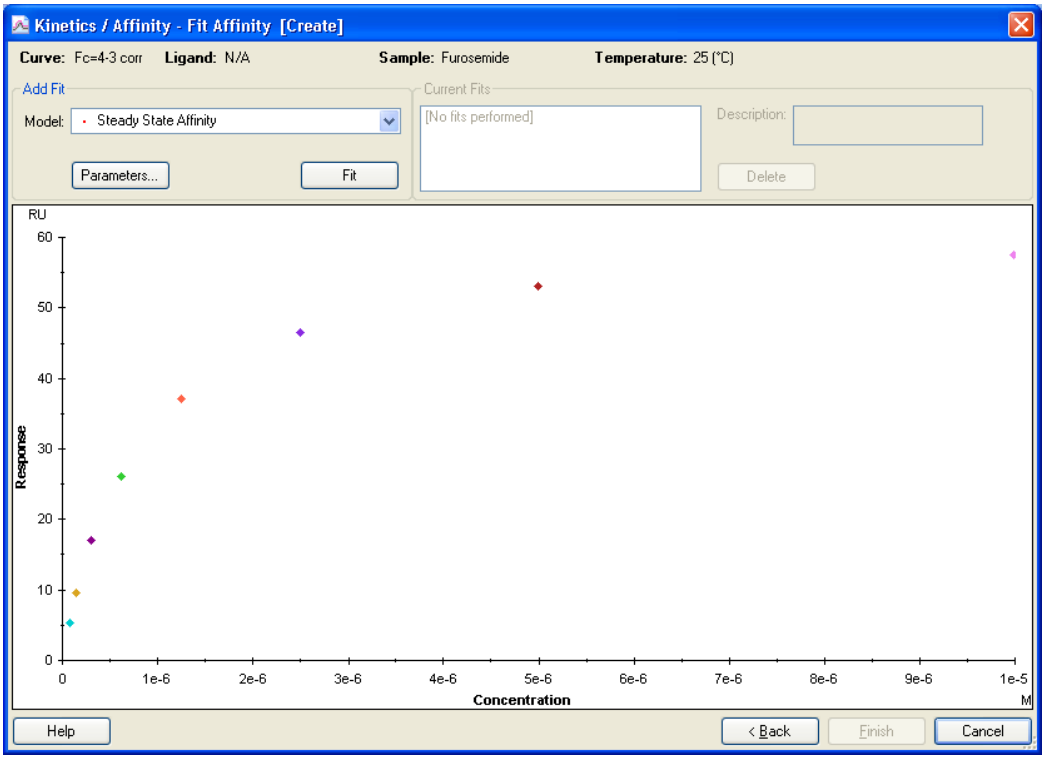
ゼロ濃度のセンサーグラムがブランクとして、全センサーグラムから差し引かれます。
Affinity >をクリックします。

↓



アナライト添加終了直前のレスポンス（RU）を平衡値（Req 値）（RU）とし、各アナライト濃度における Req 値がプロットされます。**Next >**をクリックします。

↓



X 軸＝アナライト濃度（M）、Y 軸＝Req（RU）のグラフが表示されます。

Model を選択後、**Fit** をクリックします。通常は、**Steady State Affinity** を使用します。

補足 5-18. 平衡値解析のモデル式

平衡値解析のモデル式は次の 3 つから選択できます。

Steady State Affinity

1:1 Binding モデルで、R_{max} は Fitting パラメータです。次の式を使用します。

$$R_{eq} = \frac{CR_{max}}{K_D + C} + offset$$

Steady State Affinity Constant Rmax

1:1 Binding モデルの平衡値解析で、R_{max} を指定した値で解析を行います。低アフィニティー相互作用で、アナライト濃度を高濃度で確保できない場合に使用します。モデル選択後、Fit をクリックして R_{max} 値を入力します。コントロールサンプルを高濃度で添加して得られる R_{max} を基準として R_{max} を設定します。アナライトの R_{max} 算出式は次の通りです。

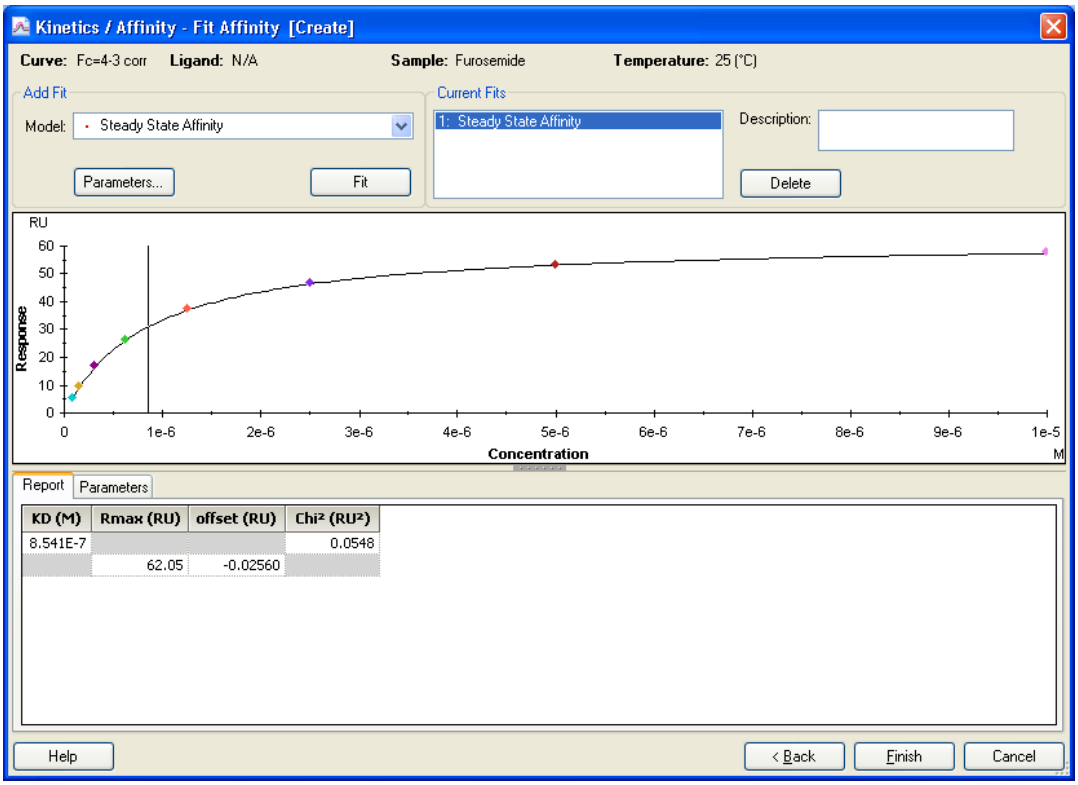
$$Rmax_{analyte} = Rmax_{control} \times \frac{MW_{analyte}}{MW_{control}}$$

Steady State Affinity Constant Rmax (Multi Site)

リガンド上にアフィニティーが異なる結合サイトが 2 つあるモデルです。以下の式を使用しています。モデル選択後に、結合が強いサイトの R_{max} 値（R_{max1}）を入力します。解析時には、R_{max1} は入力した値で解析を行います。コントロールサンプルを高濃度で添加して得られる R_{max} を基準として R_{max1} を設定してください。

$$R_{eq} = \frac{CR_{max1}}{K_{D1} + C} + \frac{CR_{max2}}{K_{D2} + C} + offset$$

↓



終了後、**Finish** をクリックします。解析結果が表示されます。グラフ上には、X 軸＝算出された K_D 値（M）のラインが表示されます。

K_D （M）	解離定数
R_{max}（RU）	アナライトの最大結合量
offset（RU）	X = 0 の時の Y 軸の値
Chi^2 （RU^2）	カイ二乗

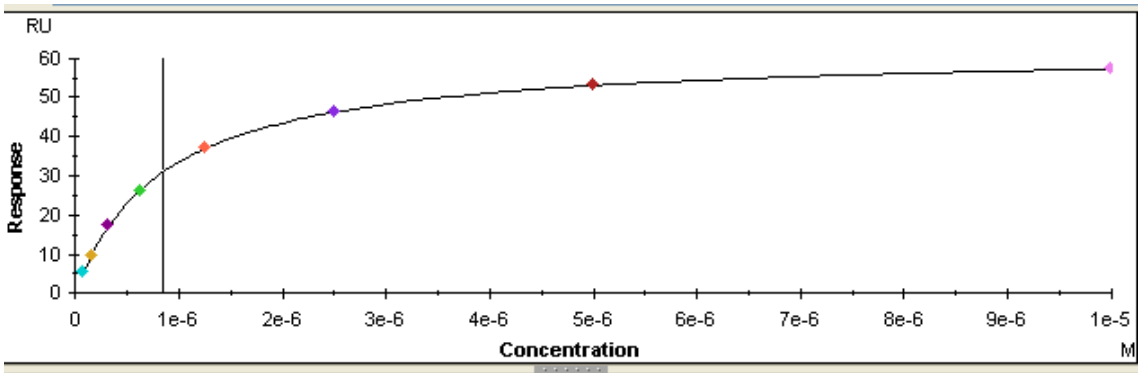
上記解析結果は、画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダに追加されます。ファイル名にはサンプル名が自動的に入力されます。

引き続き、同時に測定した別のサンプルについて解析する場合は、Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックします。

補足 5-19. 平衡値解析結果の Quality Assessment

平衡値解析において、信頼性の高い解析結果を得るためには、解析結果の K_D 値がアナライトのもっとも高濃度の 1/2 以下の濃度である必要があります。つまり、アナライトの濃度範囲が低濃度領域で、R_{max} からかけ離れた平衡値範囲で測定している場合には解析結果の信頼性は低くなります。

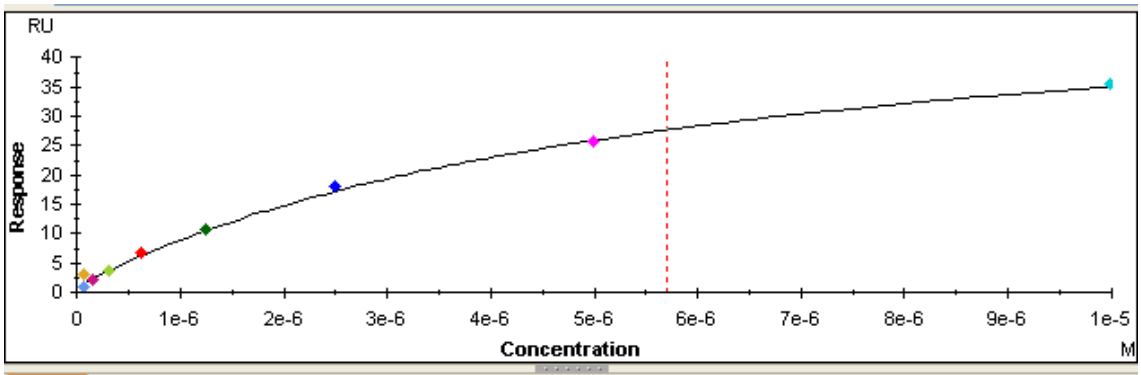
解析結果のグラフ上の、X 軸＝算出された K_D 値（M）のラインが黒色表示の場合は、アナライトのもっとも高濃度の 1/2 以下の濃度で算出されていることを表します。



Report | Parameters

KD (M)	Rmax (RU)	offset (RU)	Chi² (RU²)
8.541E-7			0.0548
	62.05	-0.02560	

以下のように赤色の破線の場合には、濃度範囲を変更して、再度、測定および解析を実施してください。



Report | Parameters

KD (M)	Rmax (RU)	offset (RU)	Chi² (RU²)
5.701E-6			0.524
	53.56	0.9490	

5-2. 反応速度定数・解離定数の算出　シングルサイクル法

マルチサイクル法とシングルサイクル法

54 ページを参照してください。

アフィニティーとカイネティクス

54 ページを参照してください。

解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a、k_d）の算出方法

55 ページを参照してください。

至適アナライト濃度

良好な結果を得るためには、予想される解離定数（K_D）値の 1/10～10 倍の濃度範囲で 5 濃度測定します。解離定数値が不明な場合には、1 nM～1 μM の範囲で、5 倍希釈系列の 5 濃度のアナライトで測定および解析を行って、算出された暫定的な K_D 値から至適濃度範囲を求めるのが望ましいです。その場合、再生ができるのであればリガンドを再生して、至適アナライト濃度で再測定できます。再生がで困難な場合には、リガンドを新しいフローセルに固定化して、至適アナライト濃度で再測定してください。
また、濃度 0 についてもアナライトと同一条件で測定します。

至適な流速

30 μl/min 以上の高流速に設定します。

アナライト添加時間と解離時間

通常は、添加 2 分程度、解離 2 分程度で測定します。ただし、結合速度が遅く結合領域のセンサーグラムが直線的な場合には、カーブが得られるよう添加時間を 5～10 分程度にします。また、解離速度が遅く、解離領域の傾きがほとんど確認できない場合には、解離時間を 10～30 分程度で測定します。

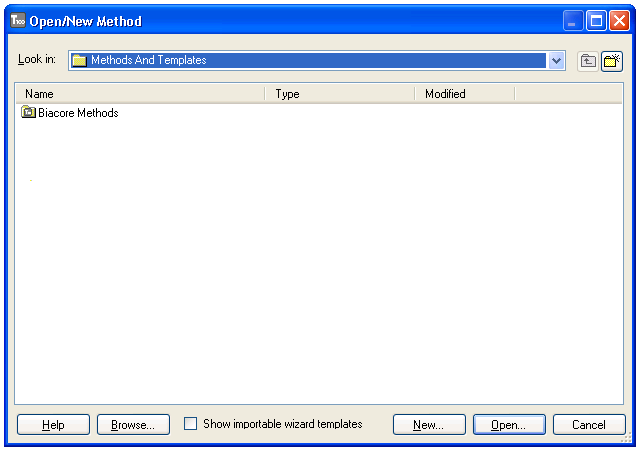
複数のアナライトの測定

通常、シングルサイクル法では、一度相互作用測定をおこなった固定化セルは繰り返し測定しません。複数アナライトがある場合や再現性を確認する場合には、その都度リガンドを新しいフローセルに固定化してください。ただし、リガンドが安定で、アナライトの解離速度が速い場合や、結合したアナライトが完全に解離するまでランニング緩衝液を流すプログラムに設定した場合に限り、複数のアナライトを同時に測定することも可能です。

5-2-1. プログラムの実行

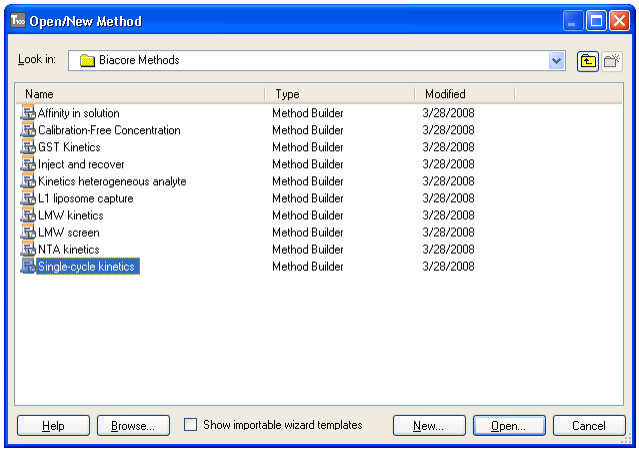
Toolbar の **Run Method** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックします。

↓



Biacore Methods を選択した後、**Open...**をクリックします。

↓



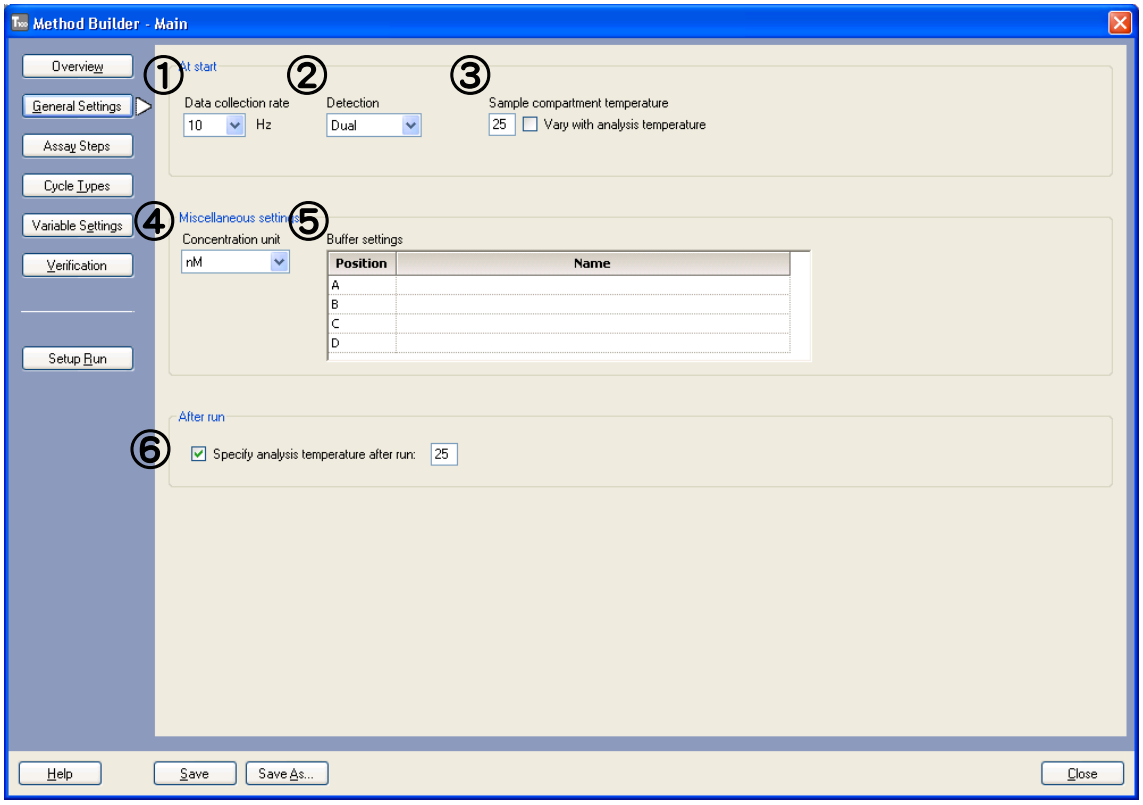
Single-cycle Kinetics を選択した後、**Open...**をクリックします。

↓

Method Builder の **Main** ダイアログが表示されます。**Overview** 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下変更項目について記載します。詳細は 6 章を参照してください。

↓

General Settings をクリックします。



① **Data Collection rate**

10Hz を選択します。

② **Detection**

検出モードを以下の 3 つ（Single,Dual,Multi）から選択します。

Single　1、2、3、4

Dual　1,2、3,4、2-1、4-3

Multi　1,2,3,4、2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

③ **Sample compartment temperature**

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定します。

④ **Concentration unit**

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択します。

⑤ **Buffer settings**

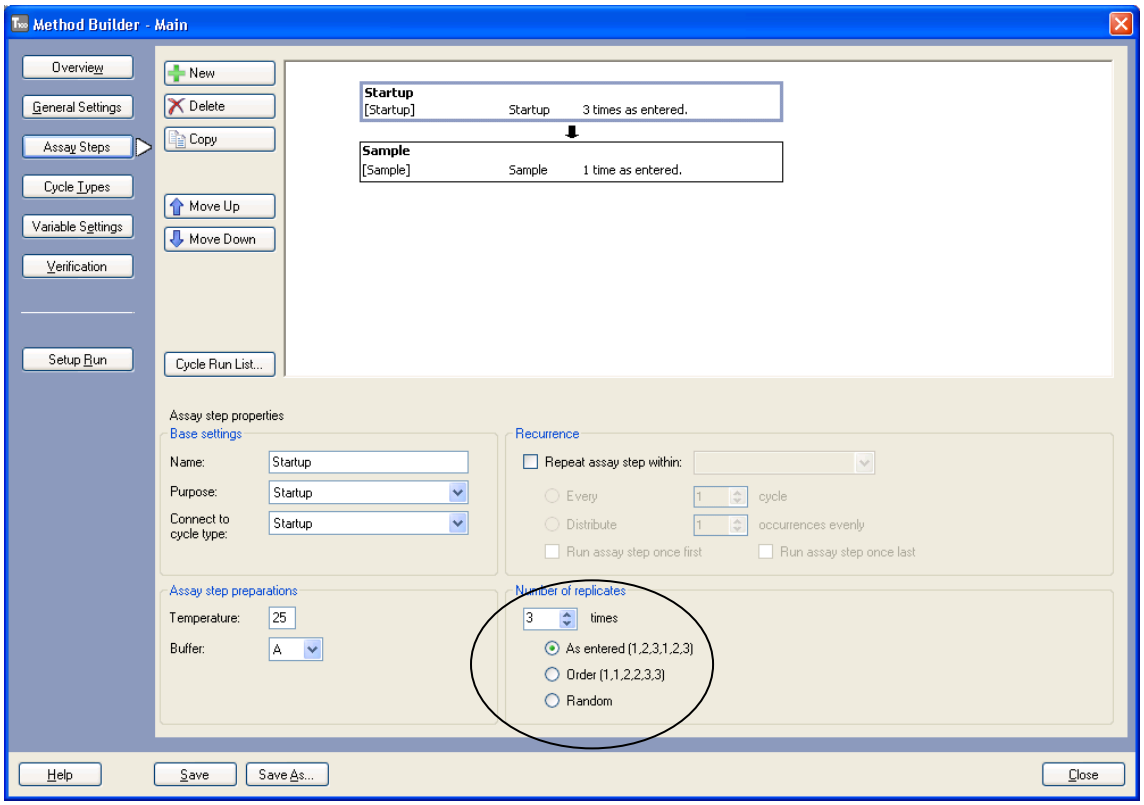
使用するランニング緩衝液名を入力します。

⑥ **After run**

チェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更されます。

設定後、**Assay Steps** をクリックします。

↓

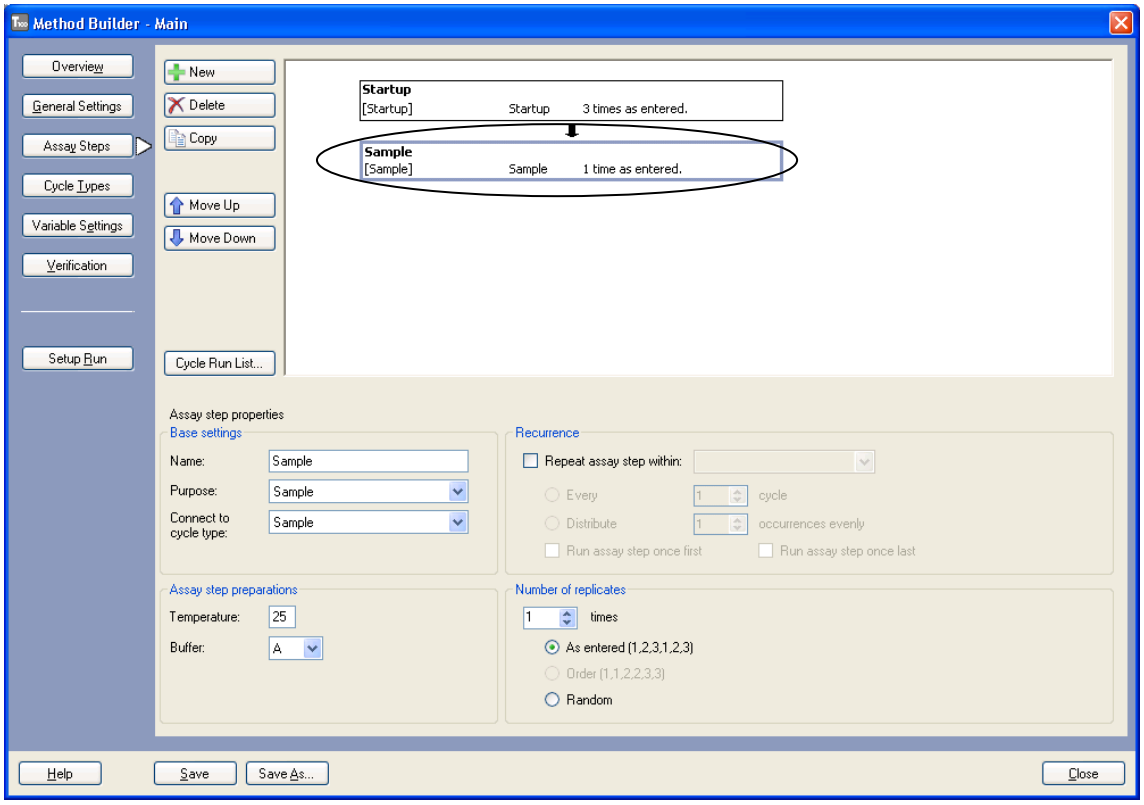


Startup を選択します。

Number of replicates

Times　ベースライン安定化のためのスタートアップの測定回数を指定します。3 回以上を推奨します。

↓



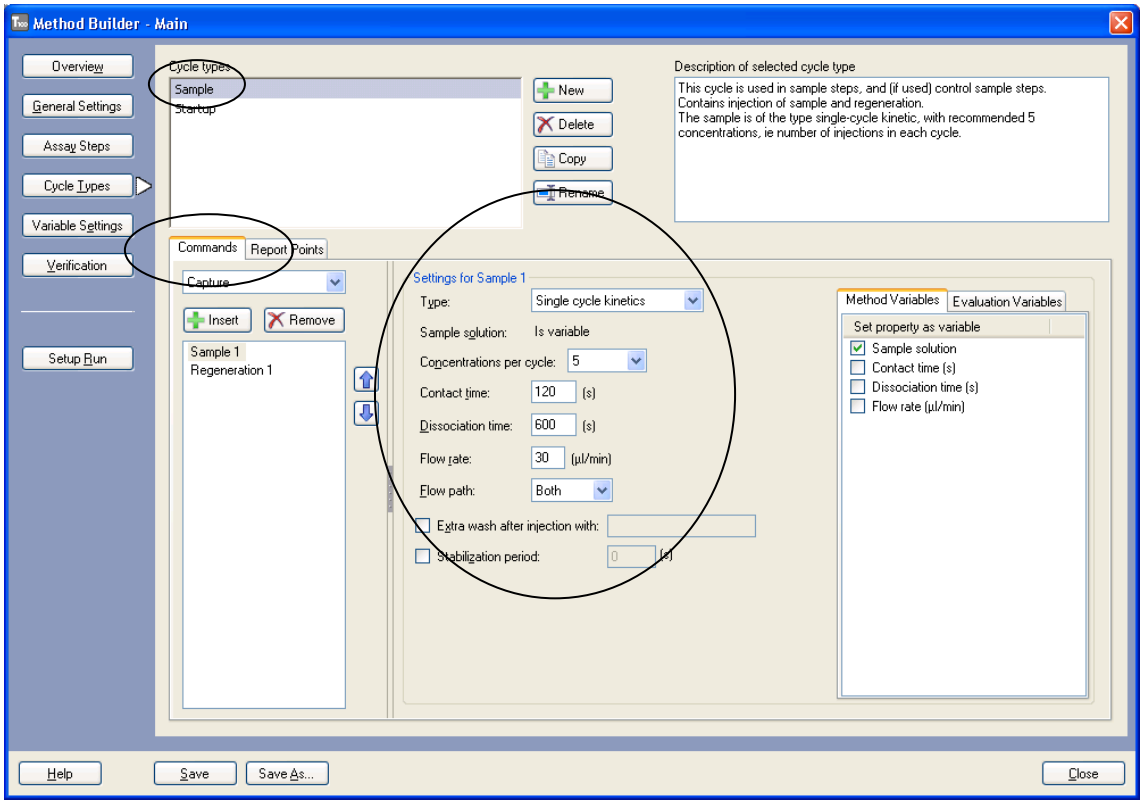
Sample を選択します。

Number of replicates

Times　　繰り返し測定回数を選択します。

↓

Cycle Types をクリックします。



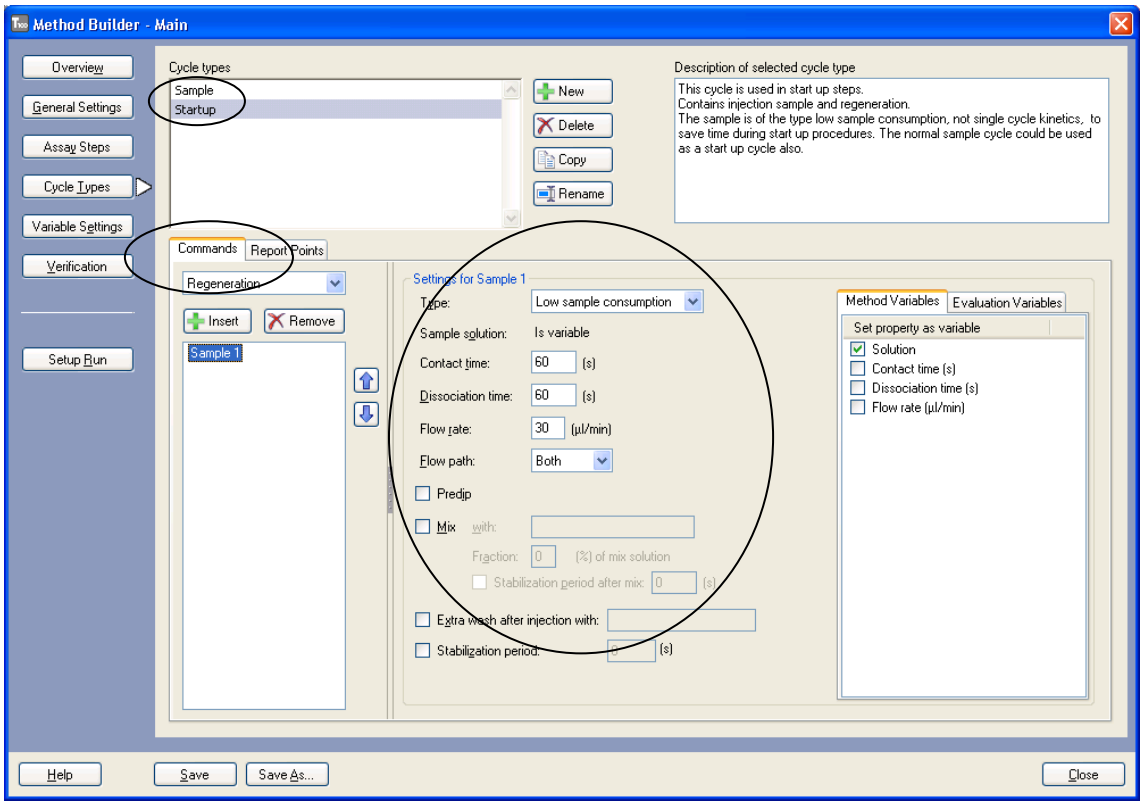
Sample をクリックします。

Type	**Single cycle kinetics** を選択します。
Concentrations per cycle	アナライトの濃度数を選択します。最大 5 濃度です。
contact time	アナライト添加時間を入力します（s）。
Dissociation time	最終添加するアナライト解離時間を入力します（s）。
Flow rate	流速（µl/min）。通常、30 µl/min。
Flow path	Both または Multi を選択します。
Extra wash after injection with:	チェックを入れると指定溶液でアナライト添加後に流路内を洗浄します。センサーチップ表面には流れません。
Stabilization period	チェックを入れると指定した解離時間後に、指定した時間ベースライン安定化のための待機時間を設定することができます。

なお、再生しない場合には、**Commands** タブをクリックして、**Regeneration** を選択後、**Remove** をクリックして削除してください。

↓

Startup をクリックします。ダミーランを設定します。

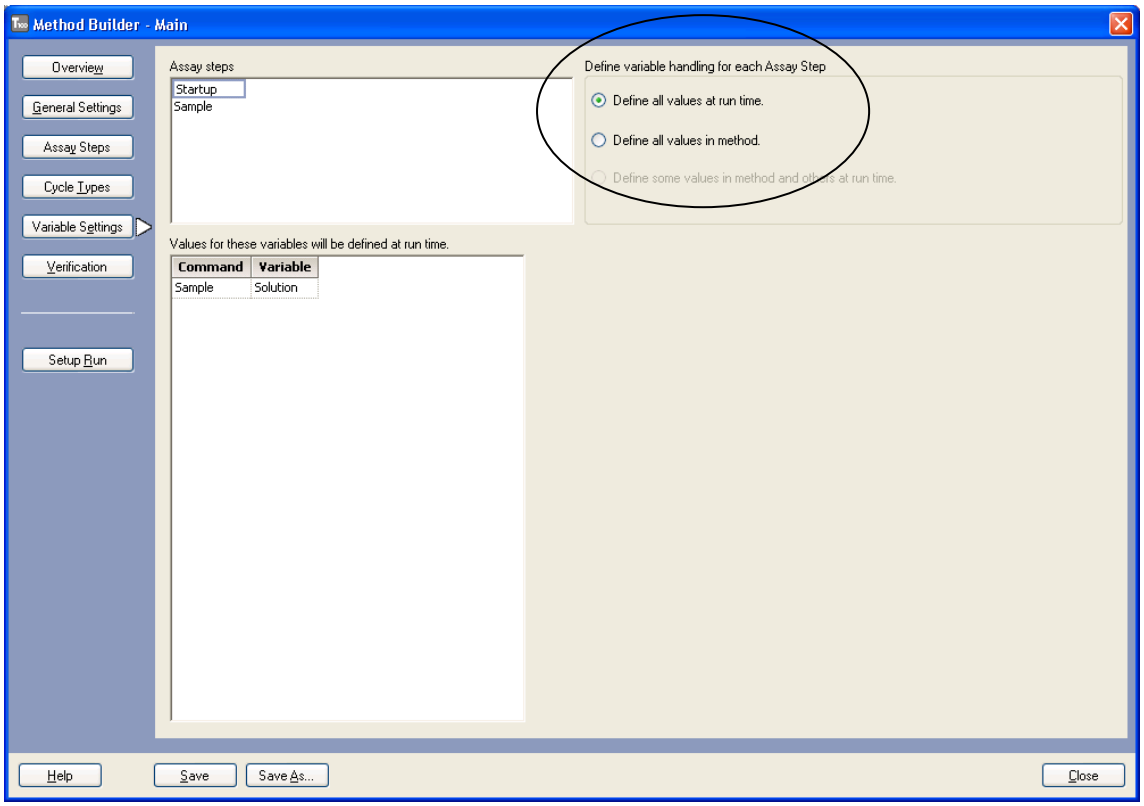


Type	**Low Sample consumption** が選択されています。
contact time	60 (s)と入力されています。変更の必要はありません。
Dissociation time	60 (s)と入力されています。変更の必要はありません。
Flow rate	30 µl/min
Flow path	Both または Multi が選択されています。

なお、再生しない場合には、**Commands** タブをクリックして、**Regeneration** を選択後、**Remove** をクリックして削除してください。

↓

Variable Settings をクリックします。



各ステップの変数をどの時点で入力するのか、画面右上の 3 項目から選択します。

Define all values at run time

測定開始直前に入力するモードです。

Define all values in Method

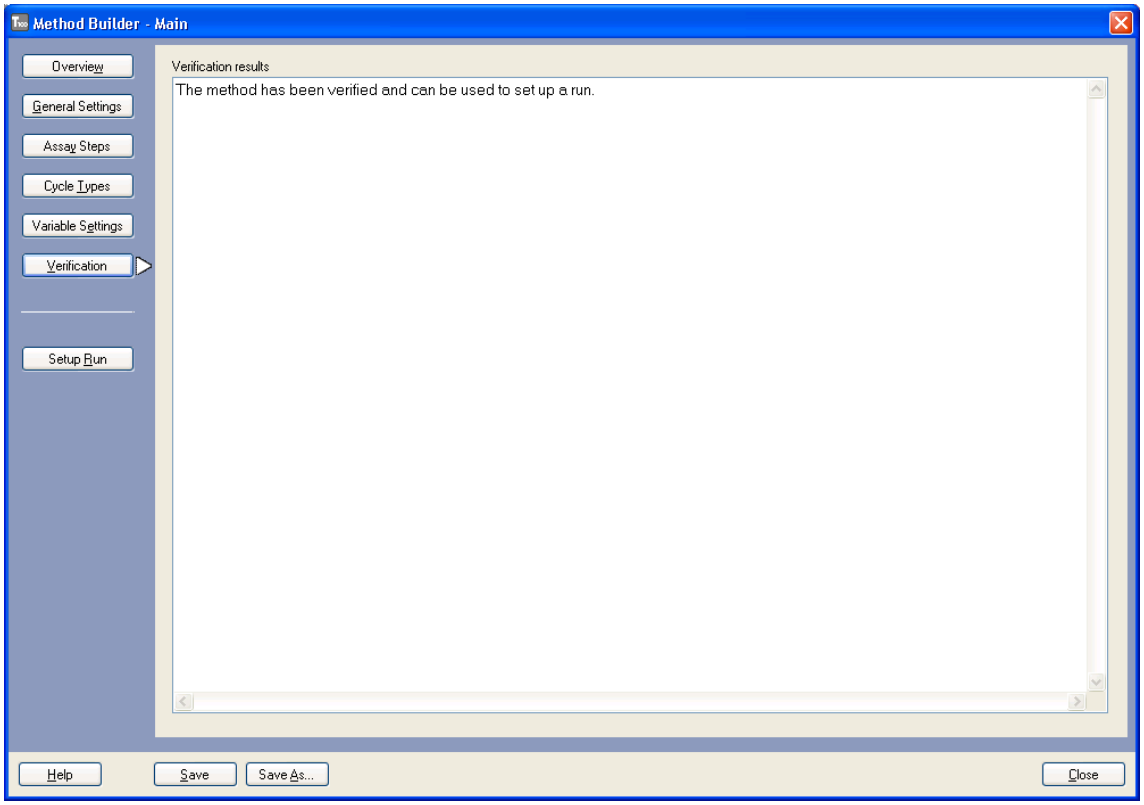
現画面上で入力するモードです。作成したメソッドを頻繁にテンプレートとして使用し、毎回変更がない場合は、ここで入力しておくと、測定直前での情報入力が不要になります。

Define some values in Method and others at run time

幾つかの情報を現画面上で入力し、その他の情報は測定開始直前に入力するモードです。

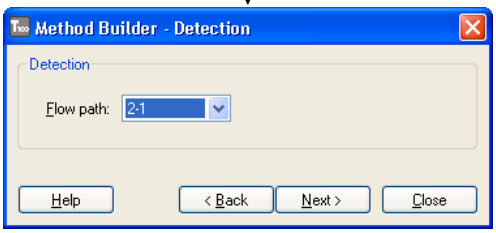
↓

Verification をクリックします。



メソッドの設定に不備が無ければ“The Method has been verified and can be used to set up a run.”と表示されます。間違いがある場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正します。確認後、Setup Run をクリックします。

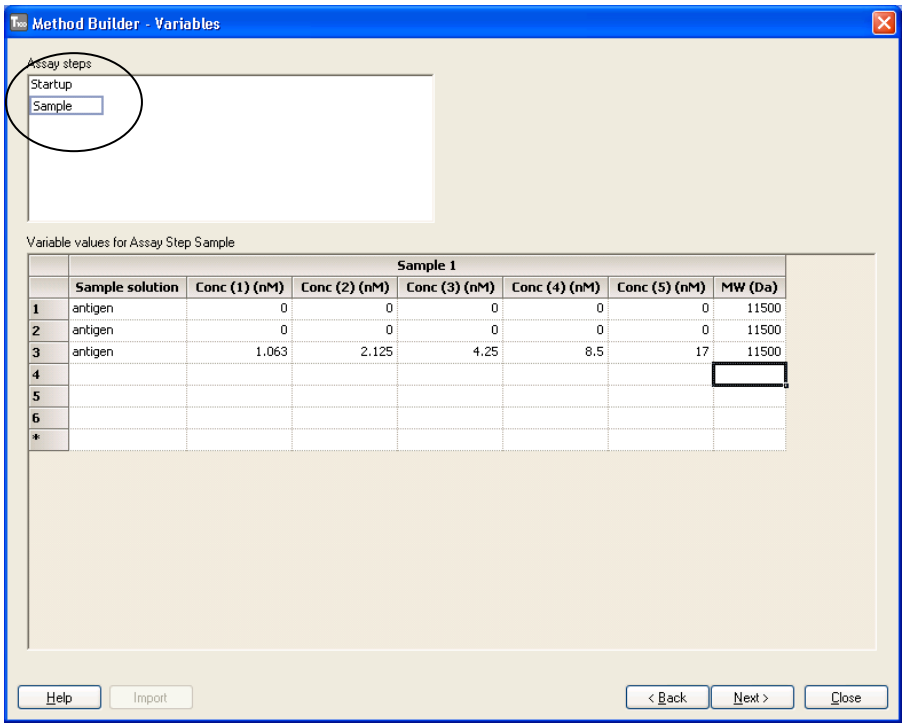
↓



適切な Flow path を選択し、Next >をクリックします。

↓

Startup、**Sample** をそれぞれクリックし、テーブルにサンプル情報を入力します。



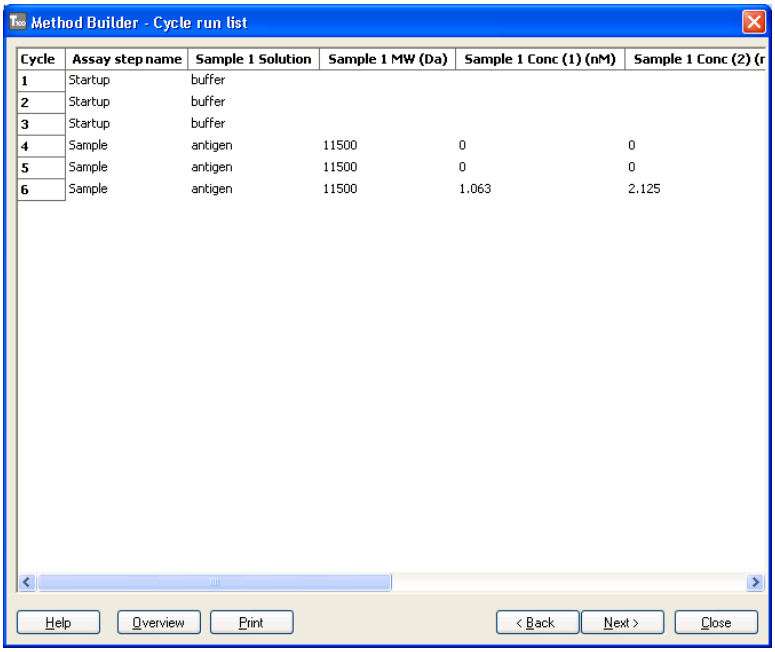
Sample1

Sample Solution	アナライトの名称
Conc（nM）	アナライト濃度
	Conc （1）→Conc （5）の順番で低濃度から順番に入力してください
MW（Da）	アナライトの分子量

サンプル測定前にアナライトゼロ濃度のサイクルを 2 回以上実施してください。

入力後、**Next >**をクリックします。

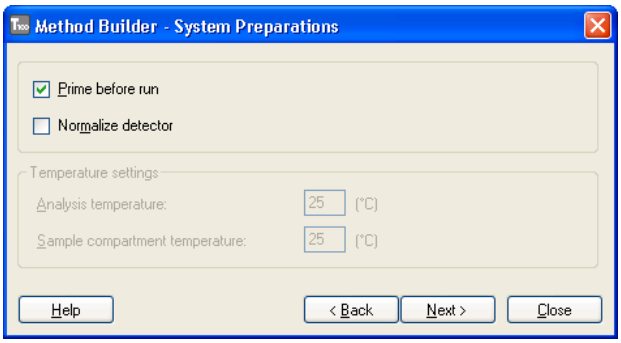
↓



測定サイクルリストが表示されます。

Next >をクリックします。

↓



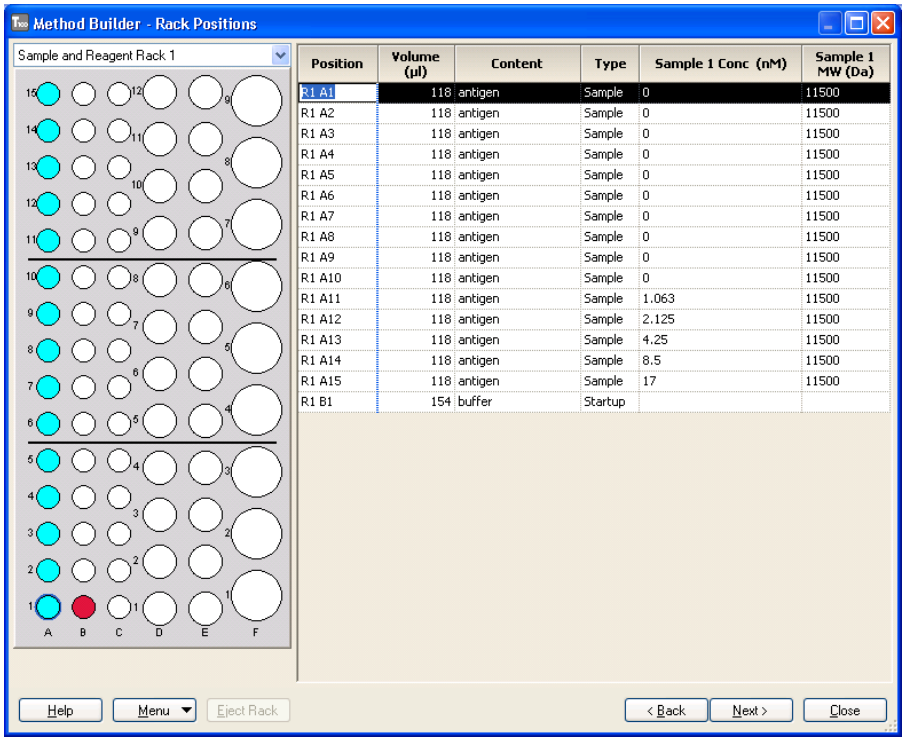
測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** をおこなう場合にはチェックを入れてください。

Temperature settings

Analysis temperature	25℃
Sample compartment temperature	25℃

入力後、**Next >**をクリックします。

↓



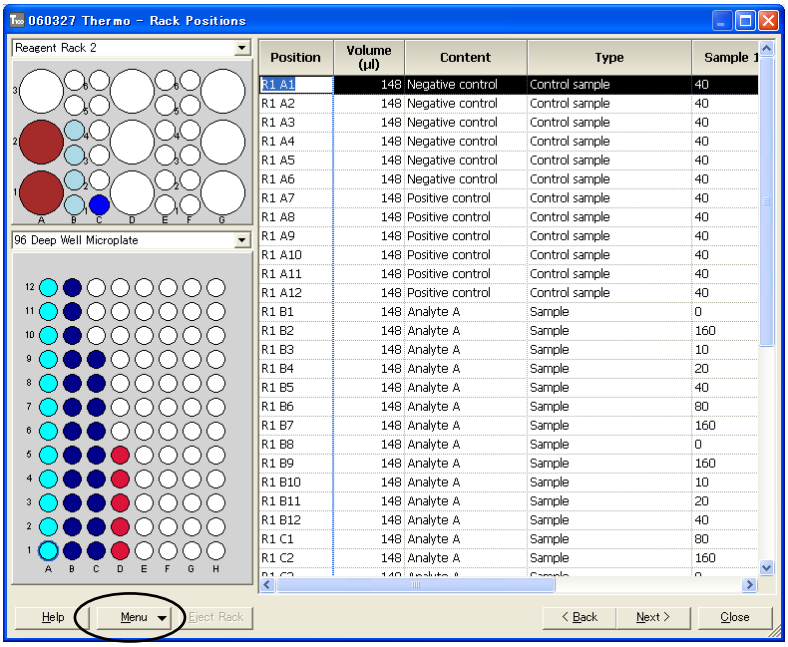
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 5-20. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

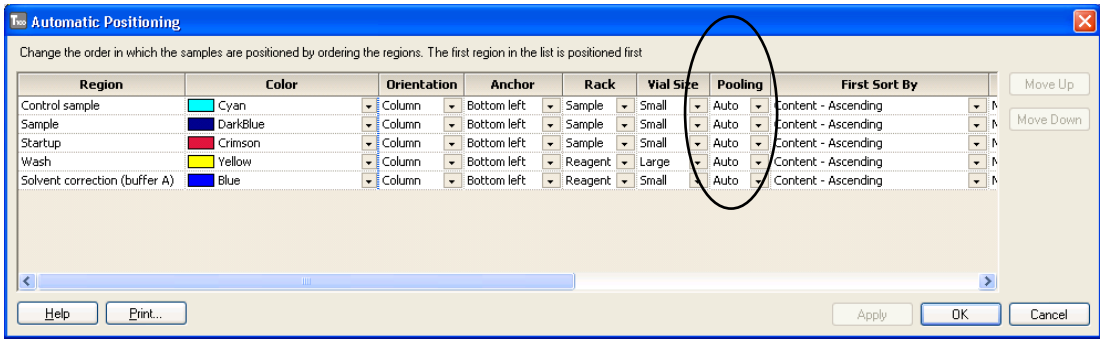
補足 5-21. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更してください。

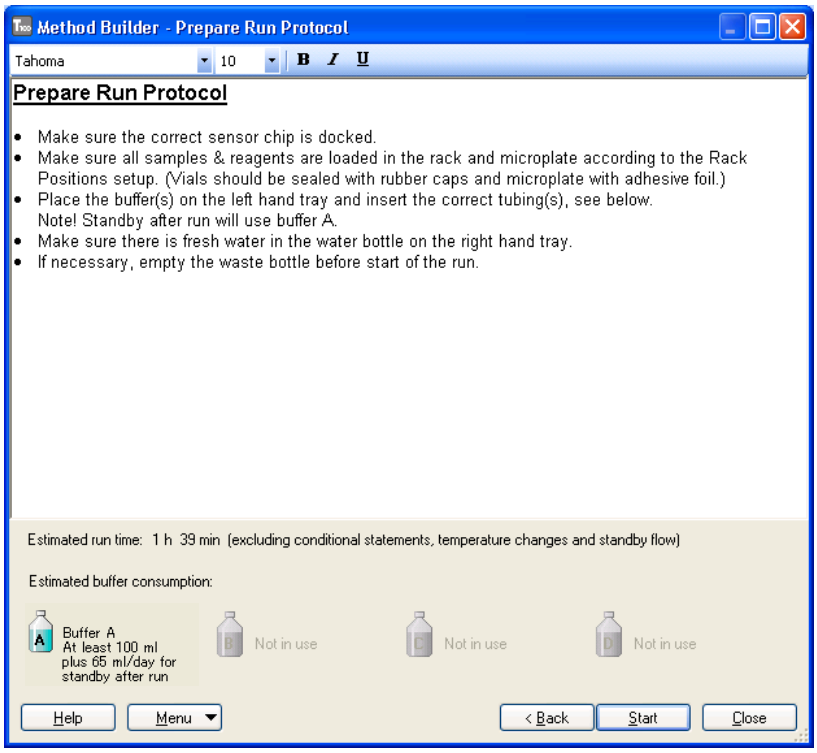
↓

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックします。

↓

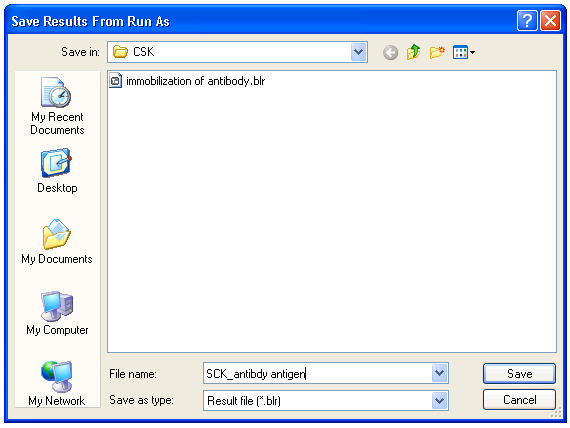

Method Builder - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 1 h 39 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Buffer A
At least 100 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

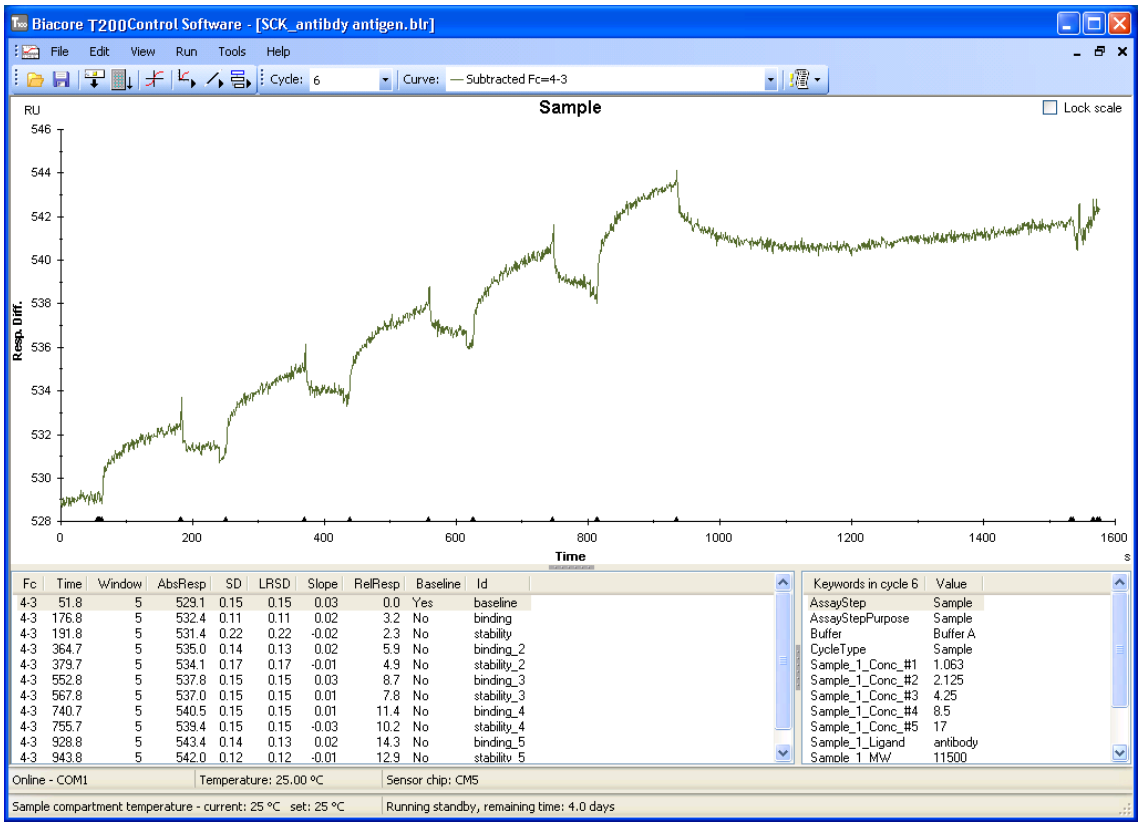
設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

↓


Biacore T200Control Software - [SCK_antibdy antigen.blr]
File Edit View Run Tools Help
Cycle: 6
Curve: Subtracted Fc=4-3
Sample
Lock scale
RU
Resp. Diff.
Time
s
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
4-3 51.8 5 529.1 0.15 0.15 0.03 0.0 Yes baseline
4-3 176.8 5 532.4 0.11 0.11 0.02 3.2 No binding
4-3 191.8 5 531.4 0.22 0.22 -0.02 2.3 No stability
4-3 364.7 5 535.0 0.14 0.13 0.02 5.9 No binding_2
4-3 379.7 5 534.1 0.17 0.17 -0.01 4.9 No stability_2
4-3 552.8 5 537.8 0.15 0.15 0.03 8.7 No binding_3
4-3 567.8 5 537.0 0.15 0.15 0.01 7.8 No stability_3
4-3 740.7 5 540.5 0.15 0.15 0.01 11.4 No binding_4
4-3 755.7 5 539.4 0.15 0.15 -0.03 10.2 No stability_4
4-3 928.8 5 543.4 0.14 0.13 0.02 14.3 No binding_5
4-3 943.8 5 542.0 0.12 0.12 -0.01 12.9 No stability_5
Keywords in cycle 6 Value
AssayStep Sample
AssayStepPurpose Sample
Buffer Buffer A
CycleType Sample
Sample_1_Conc_#1 1.063
Sample_1_Conc_#2 2.125
Sample_1_Conc_#3 4.25
Sample_1_Conc_#4 8.5
Sample_1_Conc_#5 17
Sample_1_Ligand antibody
Sample_1_MW 11500
Online - COM1
Temperature: 25.00 °C
Sensor chip: CM5
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C
Running standby, remaining time: 4.0 days

↓

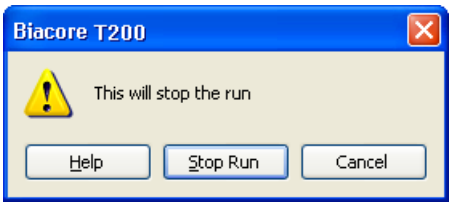
終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

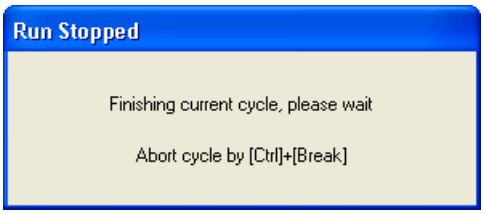
補足 5-22. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックします。



ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

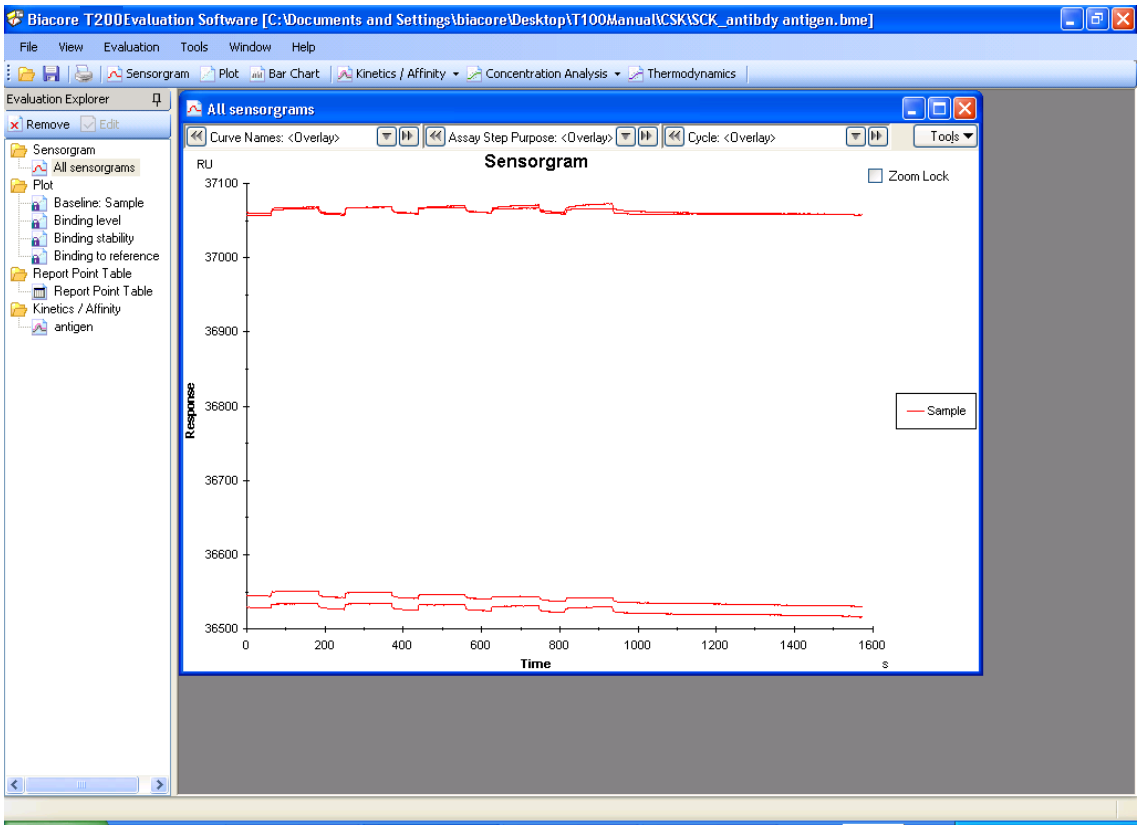
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行します。

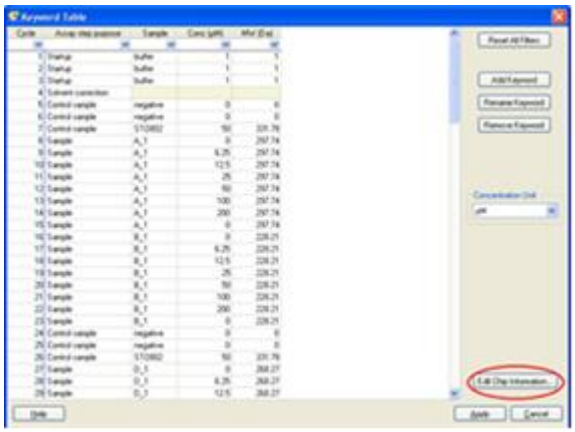
5-2-2. カーブフィッティングによる解析

メソッドを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、自動保存された取得データが開かれます。

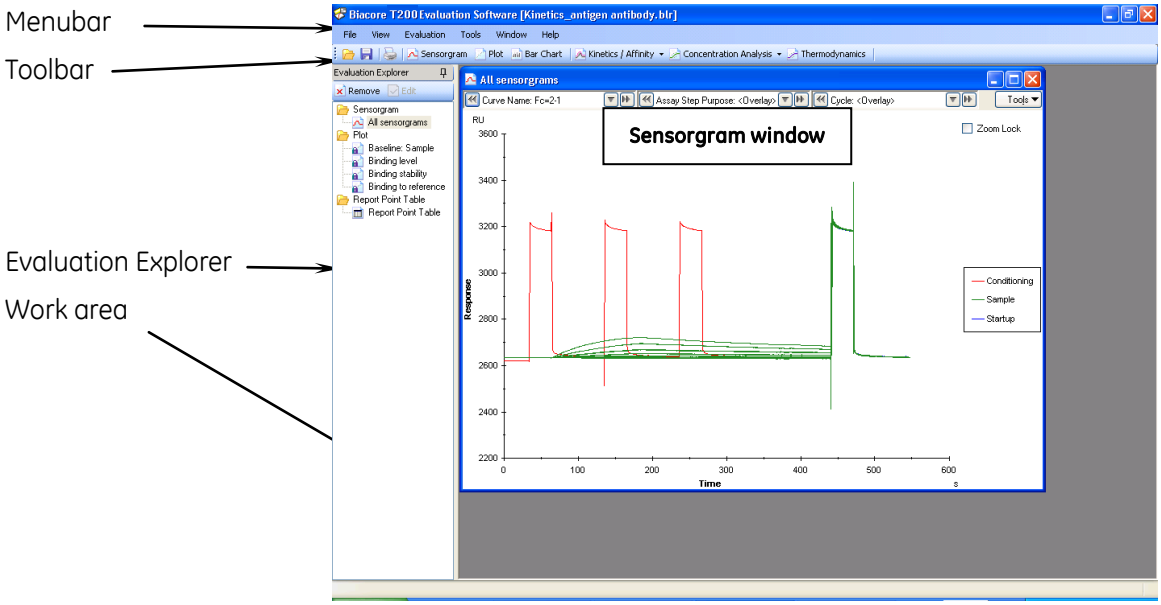


補足 5-23. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table…で変更します。Tools… → Keyword Table…をクリックします。リガンド名の変更は、右下の Edit Chip Information をクリックして変更します。



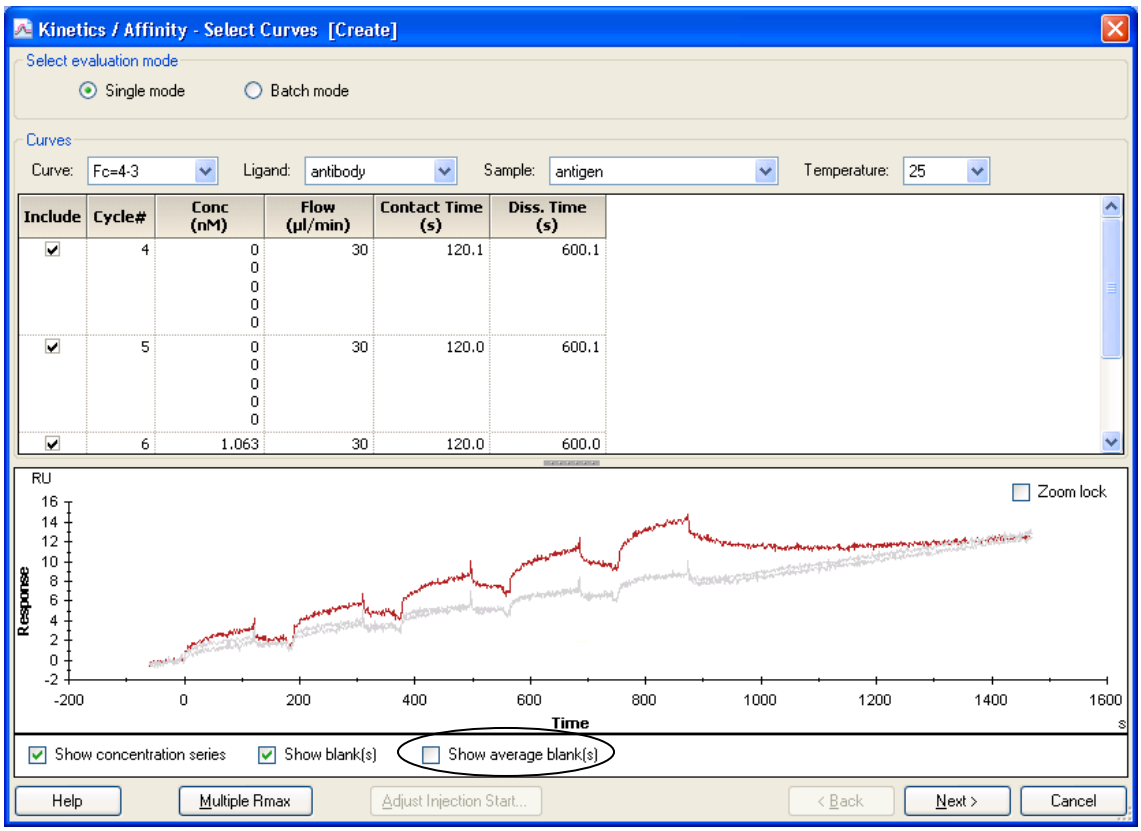
補足 5-24. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリック後、Surface bound をクリックします。

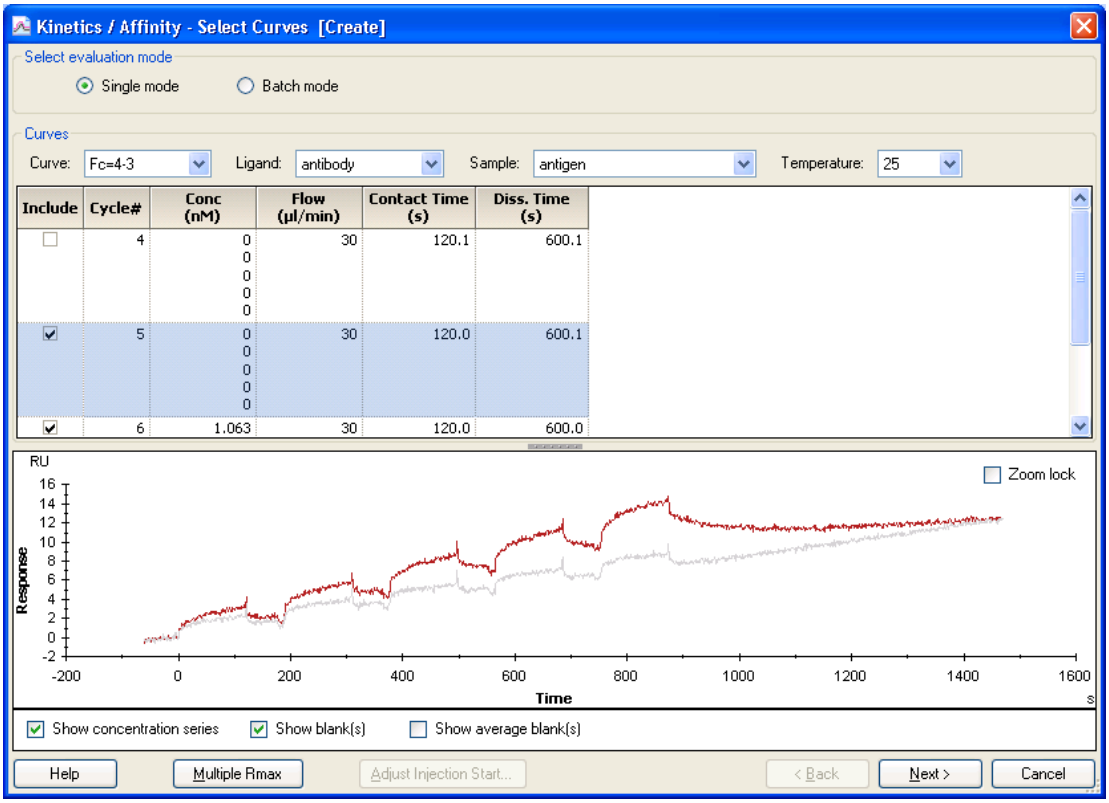
↓



同一サンプル名のセンサーグラムが重ね書き表示されます。
複数のサンプルについて同時測定している場合は、Sample:右側の をクリックすると、別のサンプルデータに移行できます。

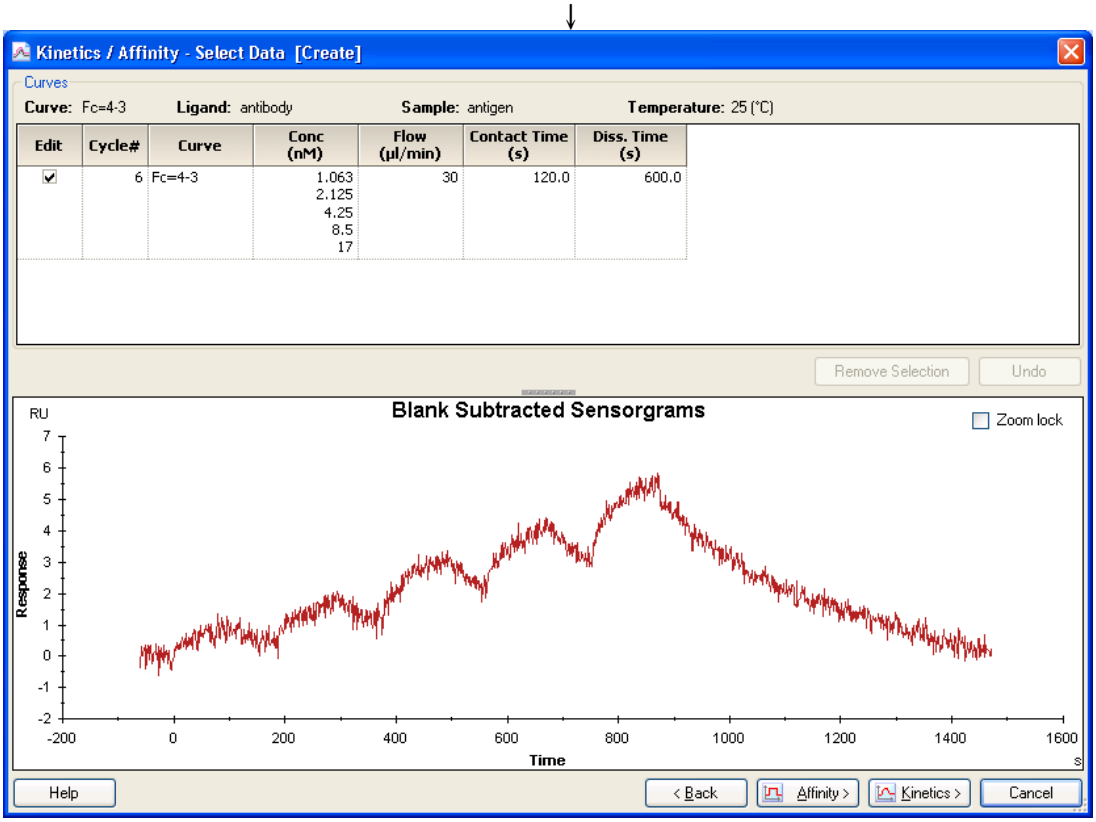
ゼロ濃度のブランクサイクルを複数回測定している場合、センサーグラム下の **Show average blank（s）**にチェックを入れると、平均したセンサーグラムが表示されます。

エアーの混入などの理由で、解析データから削除したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の Include カラムのチェックを外します。



自動的にテーブル下のチャートから、チェックを外したセンサーグラムは消えます。

Next >をクリックします。

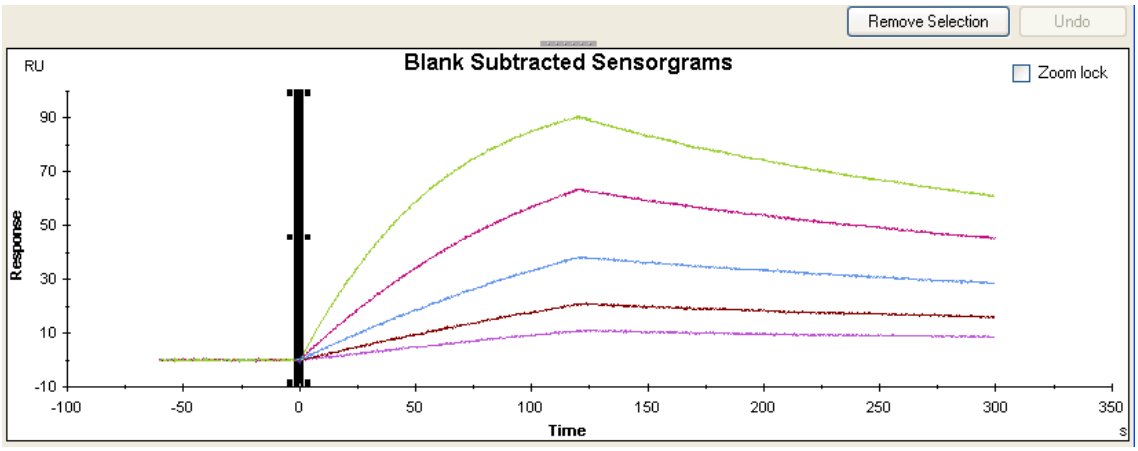


濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして全センサーグラムから差し引かれます。
Kinetics >をクリックします。

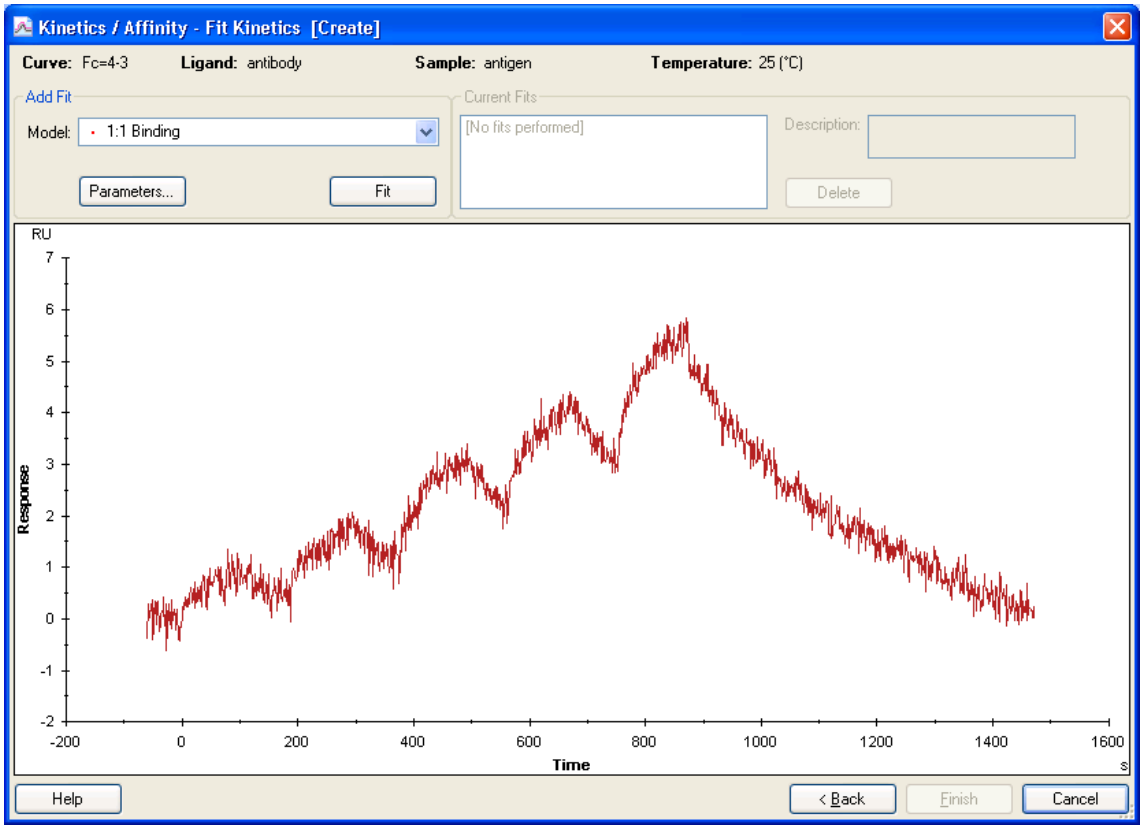
↓

補足 5-25. センサーグラムの部分的削除

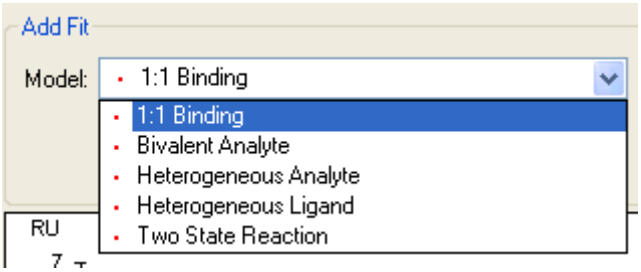
エアーの混入や添加開始・終了点のノイズなど、解析データの中から一部削除したい領域がある場合には、マウスの左ボタンをドラッグし該当の領域を拡大したのち、マウスの右ボタンをドラッグして削除する領域を選択します。拡大図を解除する場合は、センサーグラムを含まない余白をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻ります。



領域を選択すると、グラフの右上の **Remove Selection** ボタンがアクティブになります。ボタンをクリックすると選択部位が削除されます。



Model:に、フィッティングに採用する反応モデル式を選択します。▼をクリックすると、すべての反応モデルが表示されます。反応モデルが不明な場合は、1:1 Binding を選択します。



選択後、**Fit** をクリックします。

補足 5-26. 反応モデル

リガンドを B、アナライトを A とします。

1:1 Binding　　**A + B ⇔ AB**

リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合するもっとも単純な反応モデル。

Bivalent Analyte　　**A + B ⇔ AB , AB + B ⇔ AB2**

アナライトが 2 価もしくはホモ 2 量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が 2 次的に結合する反応。

Heterogeneous Analyte　　**A1 + B ⇔ A1B , A2 + B ⇔ A2B**

競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。

Heterogeneous Ligand　　**A + B1 ⇔ AB1 , A + B2 ⇔ AB2**

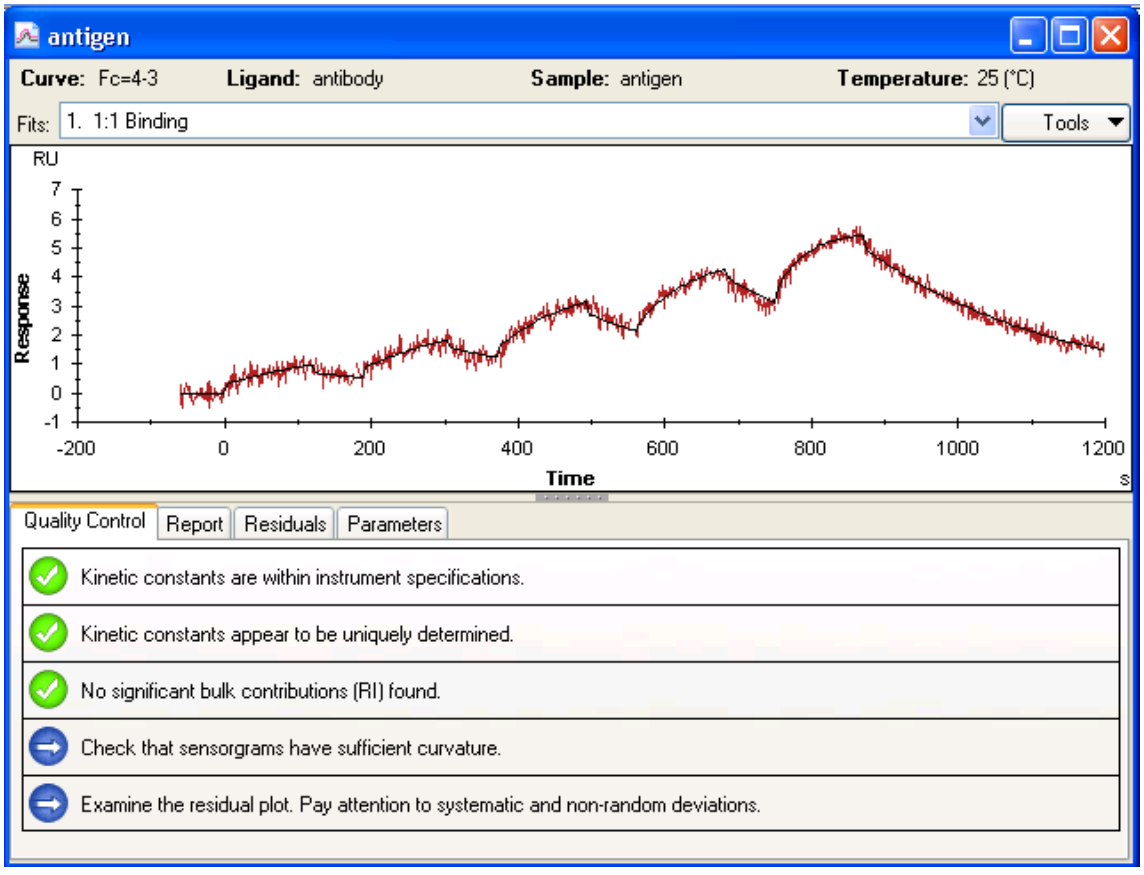
アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。

Two state Reaction　　**A + B ⇔ AB ⇔ AB***

リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

↓

解析結果が表示されます。



黒色のセンサーグラムは、フィッティングにより得られたフィッティングカーブです。
1:1 binding で解析した場合には、**Quality Control** テーブルが表示され、解析結果の評価が表示されます。

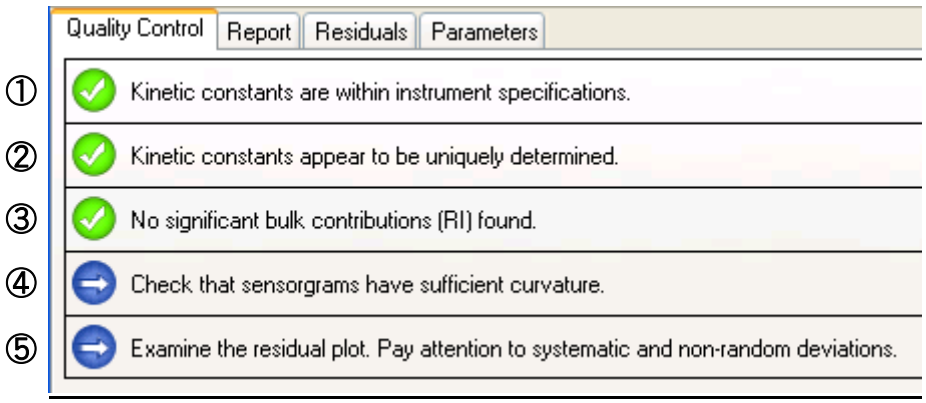
補足 5-27. 解析結果の Quality Control

5 項目の品質評価結果が、ステータスマークで表示されます。

ステータスマーク

クオリティーアセスメントにパスしています。
クオリティーアセスメントの許容限界に近いです。
クオリティーアセスメントにパスしていません。
ニュートラルまたは各自で確認します。

品質評価基準



①速度定数がシステムのスペック範囲内かどうかチェックしています。
スペックに近い場合や、超えている場合には、 が付きます。
スペック範囲　k_a = 10^3～10^7 (1/Ms)、k_d = 10^{-5}～0.5 (1/s)

②各パラメータが独立して算出されているかどうかチェックしています。
k_a、k_d および R_{max} について解析結果に与える、パラメータ間の相関性を確認しています。マストランスポートリミテーション下で測定した結果は、k_a、k_d に相関性が見られます。

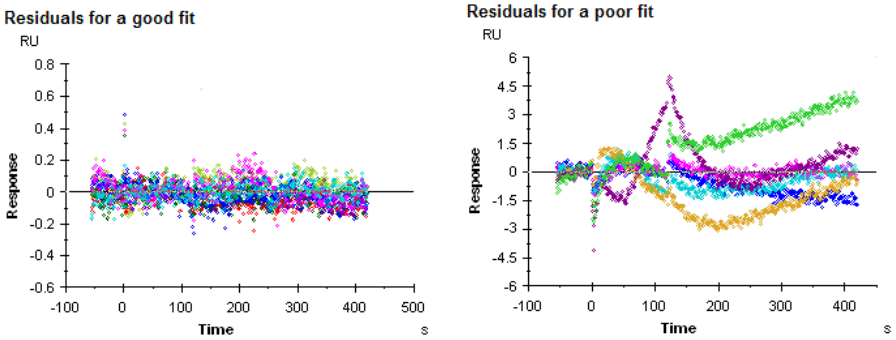
③溶液効果の値（RI）の妥当性をチェックしています。
リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引いている場合には、RI は限りなくゼロとなりますが、結合・解離速度が速くセンサーグラムが箱型の場合には、RI の値が大きく算出され、解析結果へ影響を与えます。

④センサーグラムはカーブを描いているかどうか、確認してください。

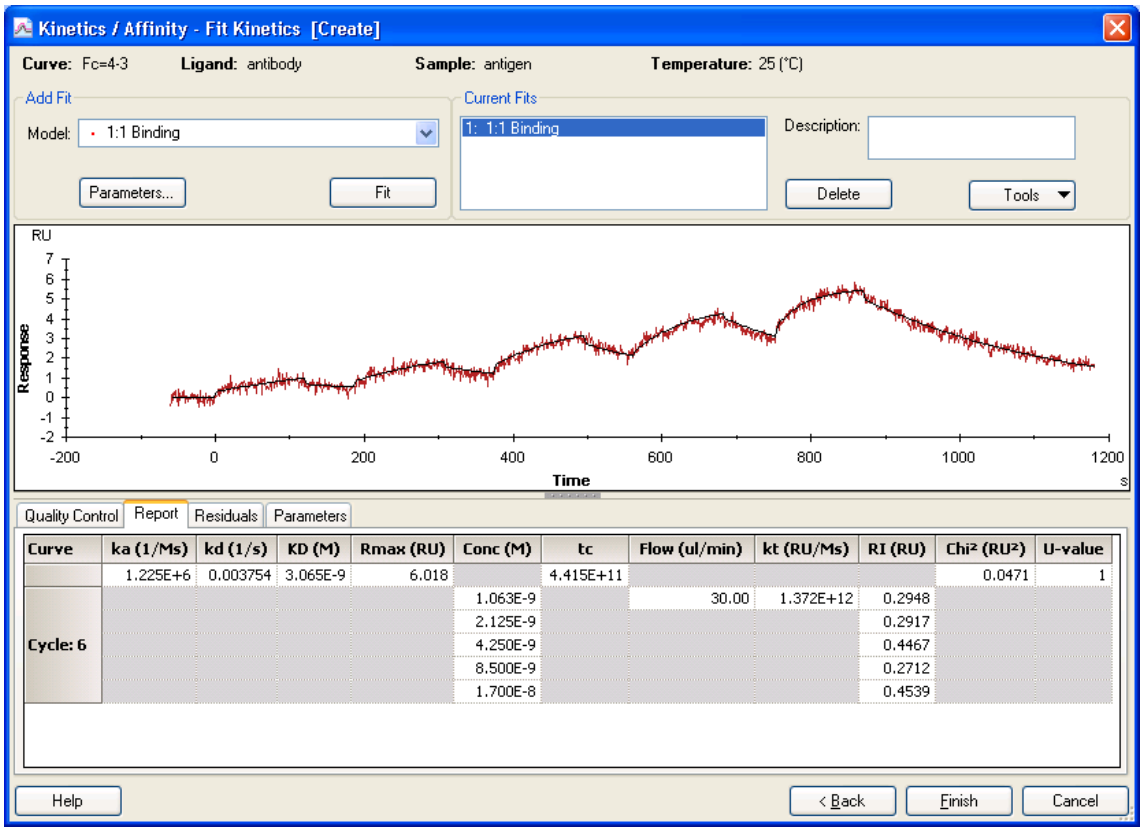
センサーグラムの結合・解離領域が直線的な場合、得られる解析結果の信頼性は低くなります。

⑤フィッティングカーブに対して測定プロットがランダムに分散しているかどうか、確認してください。

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認します。Y 軸のゼロ近傍（目安：±1～2 RU）で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できます。緑色のガイドライン内にほとんどのプロットが入っていることを確認してください。



Report タブをクリックすると、算出された各種パラメータが表示されています。



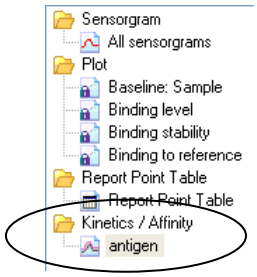
Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-value
	1.225E+6	0.003754	3.065E-9	6.018		4.415E+11				0.0471	1
Cycle: 6					1.063E-9		30.00	1.372E+12	0.2948		
					2.125E-9				0.2917		
					4.250E-9				0.4467		
					8.500E-9				0.2712		
					1.700E-8				0.4539		

k_a （1/Ms）	結合速度定数
k_d （1/s）	解離速度定数
K_D （M）	解離定数
R_{max} （RU）	アナライトの結合最大量
RI （RU）	溶液効果（bulk effect）
Chi^2 （RU^2）	カイ二乗
U-value	U-バリュー（既存の 1:1 Binding モデル使用時のみ）

Finish をクリックします。

↓

上記解析結果は、画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダに追加されます。ファイル名にはサンプル名が自動的に入力されます。



引き続き、同時に測定した別のサンプルについて解析する場合は、Toolbar の

をクリックします。

補足 5-28. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られたフィッティングカーブがほぼ重なります。センサーグラムの傾きが大きく異なる場合、フィッティングは良好ではないと判断します。また、解析結果の RI 値が 0（RU）に近いか確認します。

統計学的には、以下の各項目を確認します。

Residual

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認します。Y 軸のゼロ近傍（目安：±1～2 RU）で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できます。緑色のガイドライン内にほとんどのプロットが入っていることを確認してください。

Chi²

測定データとフィッティングカーブ間の差を示します。良好なフィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致します。

U-value

解析値が信頼できるか否かを判断する値です。15 以下であれば問題ありません。25 以上になると、算出された値の信頼性は低くなります。

SE （Standard error）

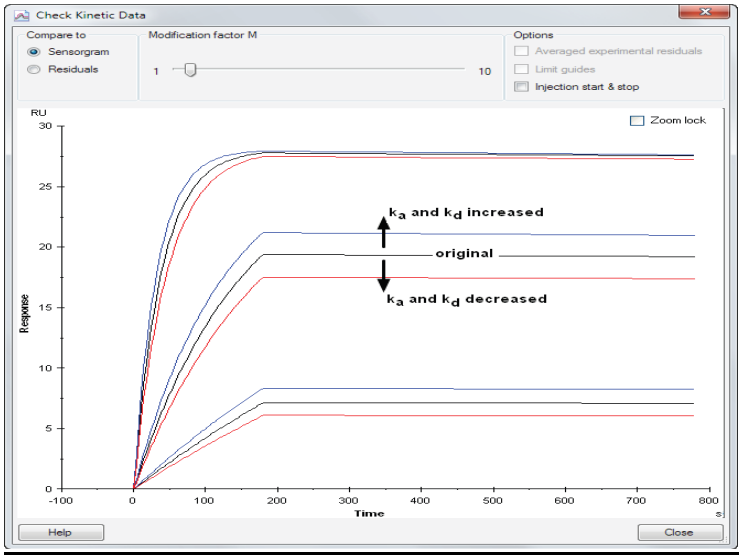
各パラメータについて SE（標準誤差）が表示されます。各パラメータの解析結果に対して、SE の値が 10%以下であれば問題ありません。

Check Kinetic Data

解析ウインドウ右上の Tools にあります。マストランスポートリミテーションの影の強さを確認します。

ウインドウ上の Modification factor M のスライダーを 1 から 10 まで移動します。この際、解析結果の黒色のセンサーグラムに対して、赤色と青色のセンサーグラムの変化を確認します。赤色と青色のセンサーグラムは、黒色のセンサーグラム

の k_a、k_d 値を factor M（1～10）で割った場合と掛けた場合に得られるセンサーグラムです。変化が小さい場合はマストランスポートリミテーションの影響が強いと判断します。



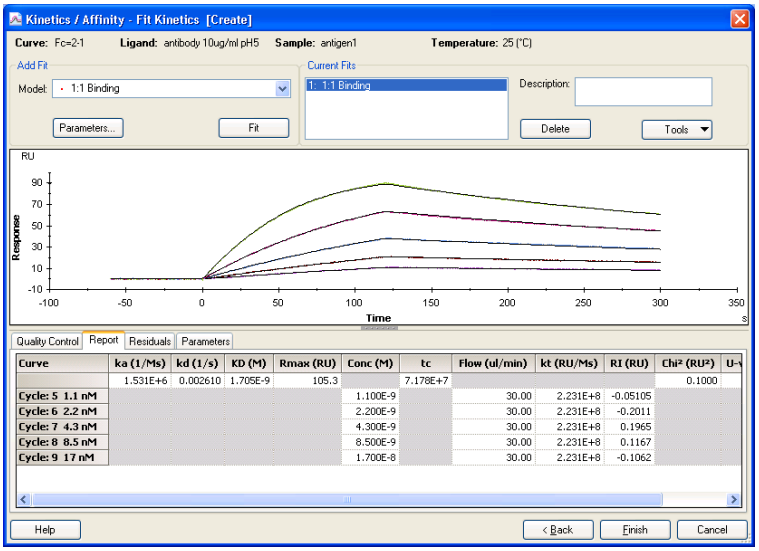
フィッティングが良好ではない要因

①フィッティングに採用したモデルが異なっている
②箱型のセンサーグラムである
③経時的なリガンドの活性低下が考えられる
④再生が不十分である
⑤アナライト濃度の調製ミスが考えられる　等

①が要因と考えられる場合は、再度妥当な反応モデルを選択し解析してください。
②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になることがあります。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうからです。この場合は、RI=0 （Constant）として再解析してください。
複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセンサーグラムにおいて k_a, k_d, R_{max} が同一のパラメータであることが前提となります。しかし、上記③～⑤の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメータは必ずしも一致しません。
例えば、R_{max} は、リガンドに対するアナライトの最大結合量（RU）であり、理想的な実験系では、連続して同一セルを使用している限り、どの濃度のセンサーグラムに対しても同一値となります。ところが、リガンドの再生が不十分な場合や、再生操作によりリガンドの活性がサイクルごとに低下している場合には、R_{max} はサイクルごとに低下します。フィッティングが良好でない要因が、測定結果から明らかに R_{max} にある場合は、R_{max} が同一パラメータであることを解除し再解析してください。

補足 5-29. カーブフィッティングにおける再解析

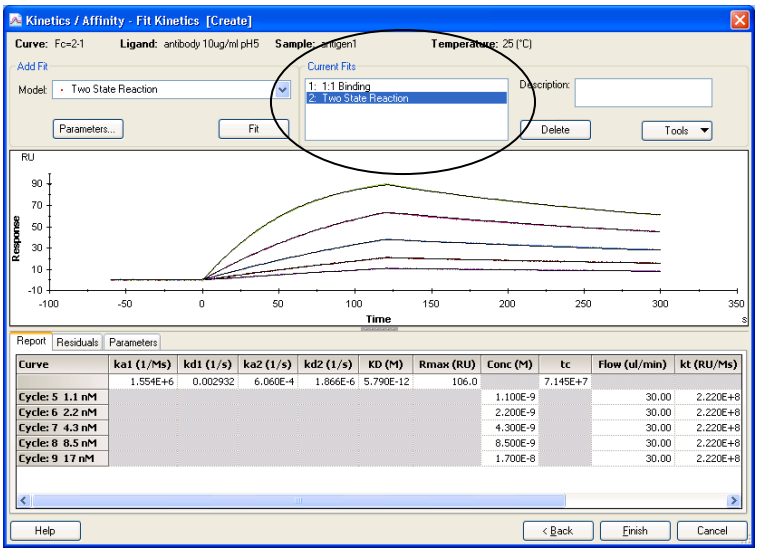
反応モデルの変更



反応モデルを変更し再解析する場合は、**Finish** をクリックせず、**Add Fit** ボックスの **Model:** 右側の▼をクリックし、新しい反応モデルを選択します。**Fit** をクリックします。

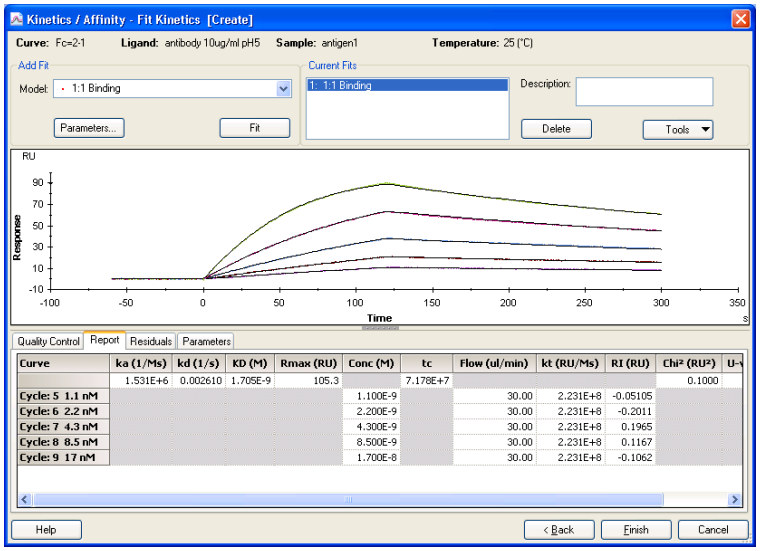
↓

新しい解析結果が表示されます。



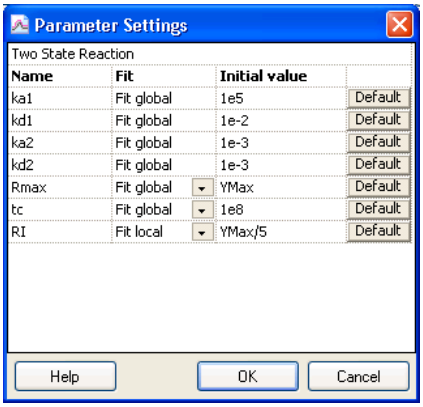
解析したすべての結果は、履歴として、**Current Fits** ボックスに残ります。
前の解析結果を見る場合は、**Current Fits** ボックスの目的の反応モデルをクリックすると結果が表示されます。終了後、**Finish** をクリックします。

解析パラメータの解析設定条件の変更



解析パラメータ（R_{max} ,RI）の解析設定条件を変更し再解析する場合は、**Add Fit** ボックスの **Parameters** をクリックします。

↓



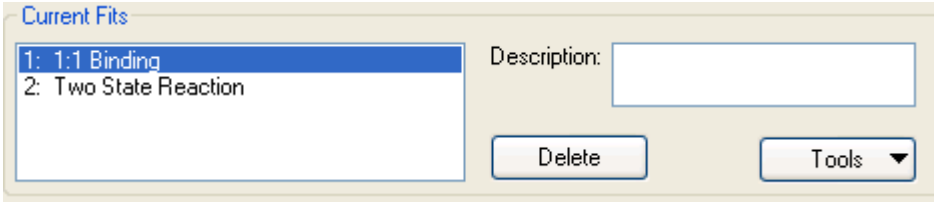
経時的なリガンドの活性低下や再生の不十分さが原因で、全センサーグラムにおいて、R_{max} を同一パラメータとみなせない場合、R_{max} の行の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Fit local** を選択します。

箱型のセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているにもかかわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI としてみなしてしまう場合、RI の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Constant** を選択します。Initial value は自動的に 0 が入力されます。

Parameter Setting ダイアログ中の **OK** をクリックすると、条件が適用されます。
引き続き、**Fit** をクリックすると解析結果が表示されます。

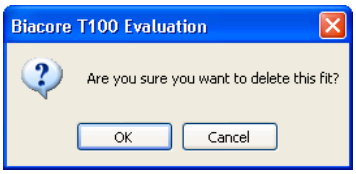
補足 5-30. 解析履歴からの結果の消去

解析結果を履歴から消去する場合は、**Current Fits** ボックス中の目的のデータを選択します。



Delete をクリックします。

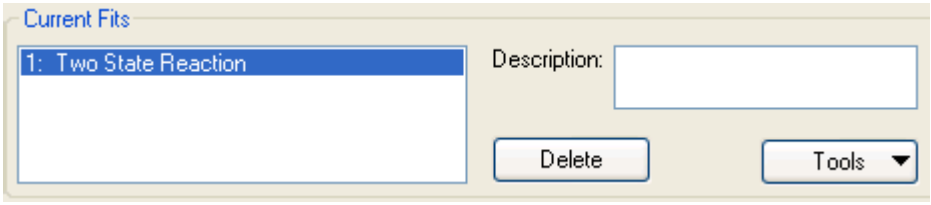
↓



確認ダイアログが表示されます。

消去する場合は **OK** をクリックします。

↓



解析結果が消去されます。

6. メソッドによるプログラムの作成

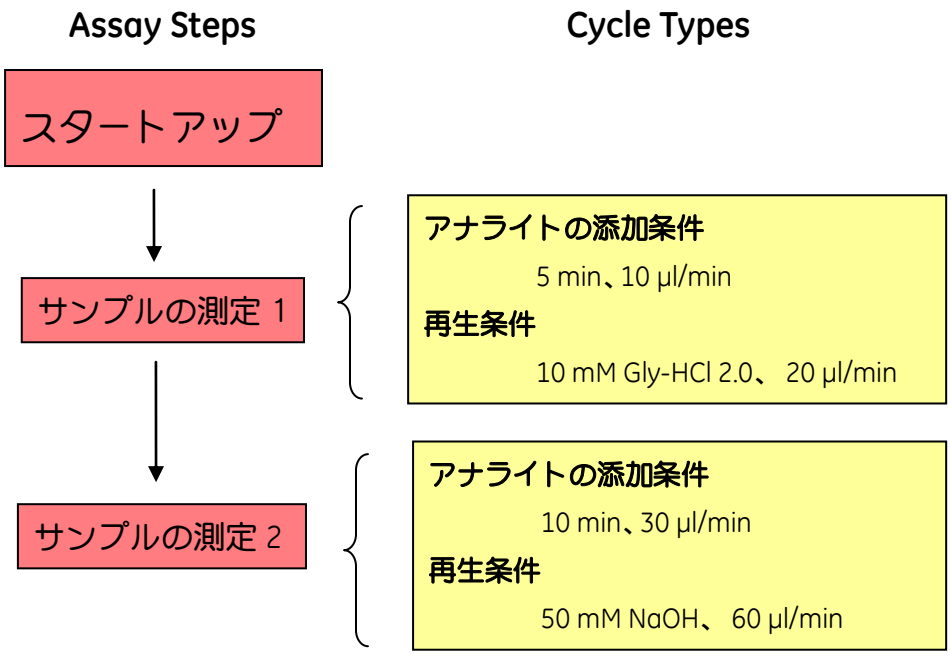
ウィザードで作成するプログラムには、リファレンスの選択や再生溶液の添加回数などに制約があります。そこで、ウィザードでは対応できない複雑なプログラムを使用したい場合は、メソッドビルダーを使用してメソッドを作成します。作成時には、あらかじめ実験目的に応じたウィザードテンプレートから望みに近いプログラムを作成して保存したファイルをメソッドビルダーで編集すると、効率も良く間違いが減ります。

メソッドの構成

メソッドビルダーの重要な設定項目は“**Assay Steps**”と“**Cycle types**”です。

始めに、**Assay Steps** で測定全体のアウトラインを設定します。一つもしくは複数の測定ステップを設定します。それぞれの測定ステップは Startup、Samples、Control Samples などの測定目的別で設定します。

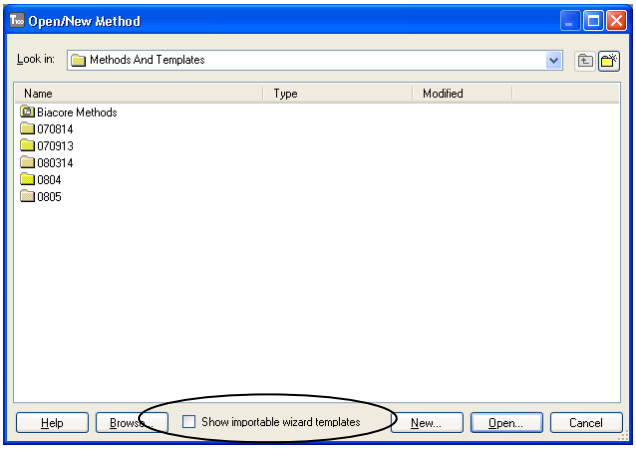
Cycle types では、測定ステップ別に詳細なプログラム（温度、流速、試料の添加順序など）を設定します。



6-1. ウィザードで作成保存したプログラムの呼び出し

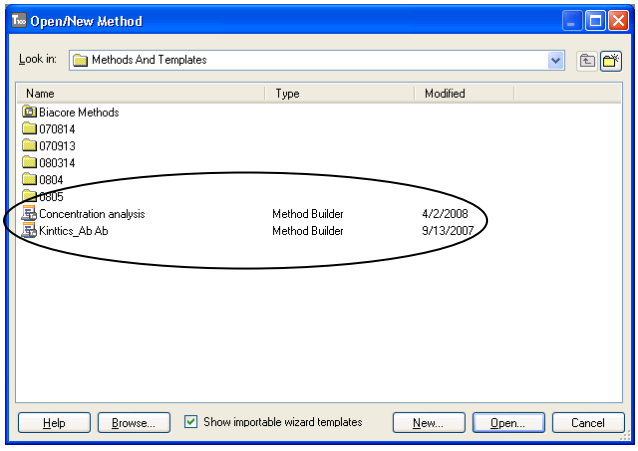
実験目的別に既存のテンプレートがあります。既存のテンプレートがない場合には、実験目的に応じたウィザードで実験条件に近いプログラムを作成・保存しておきます。その後、以下の操作に従ってメソッドを作成します。

Toolbar の **Run Method** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックします。



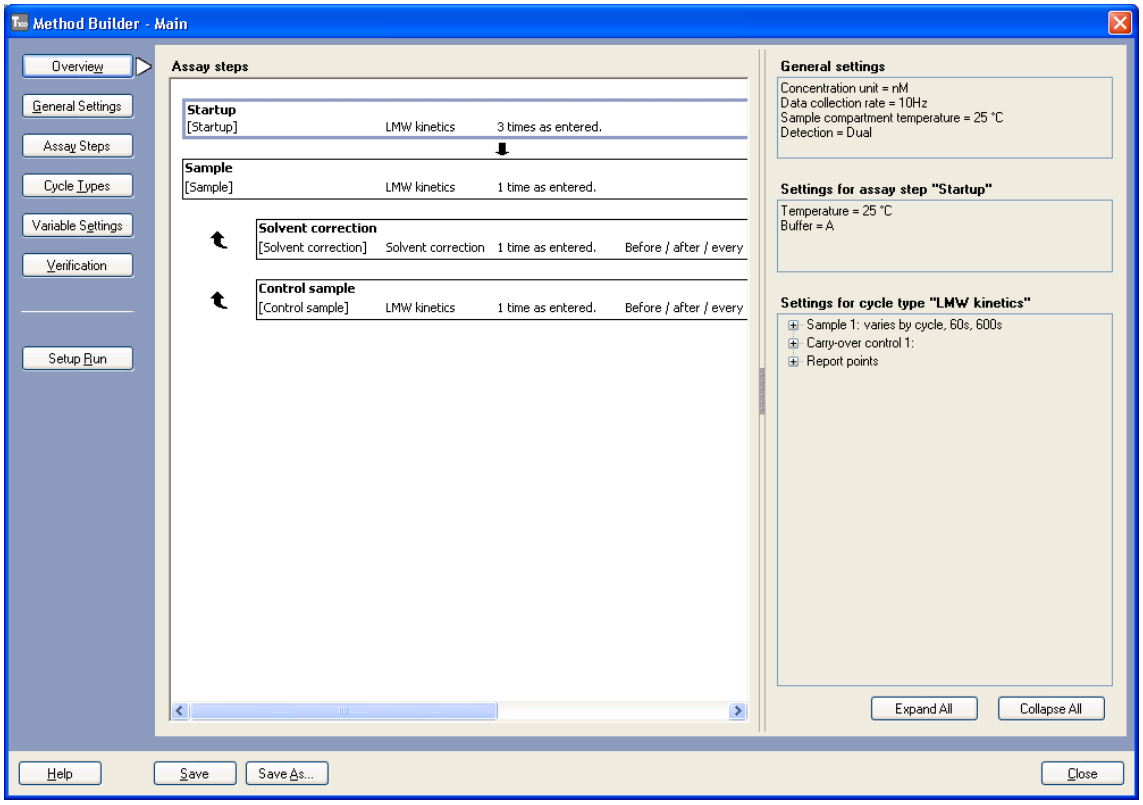
Show importable wizard templates にチェックを入れます。

↓



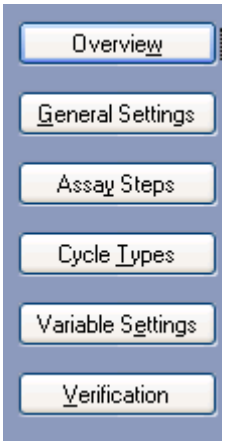
Methods and Templates フォルダ内に保存されているウィザードファイルが表示されます。それ以外のフォルダに保存したファイルを呼び出す場合は、**Browse...**を利用します。目的のファイルを選択し、**Open...**をクリックします。

↓



ウィザードで入力されていた情報が自動的にメソッドの形式に変換されます。ファイルを開いた直後は、メソッドビルダーの **Overview** 画面が表示されています。

6-2. メソッドの編集



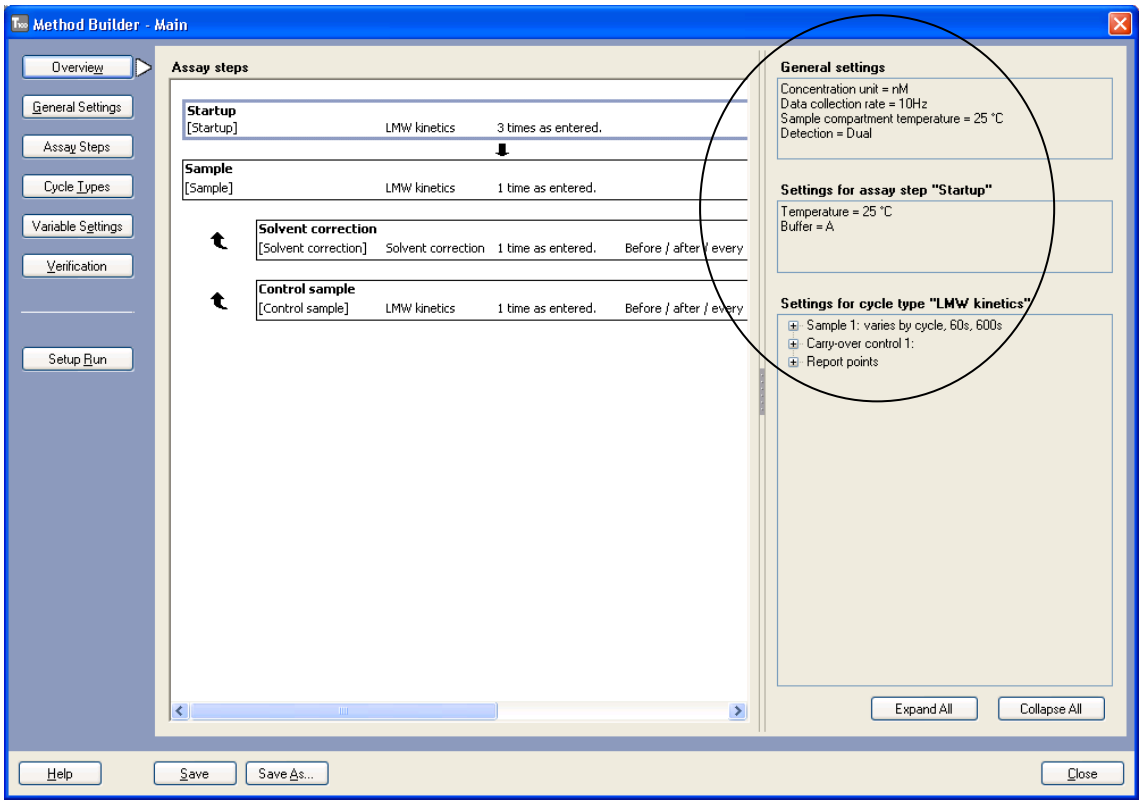
画面左列に設定ボタンが存在します。**General Settings** から **Verification** までの上から 5 つのボタンでメソッドを作成します。

Overview	測定内容の表示
General Settings	システム初期条件の設定

Assay Steps	測定全体のアウトラインの作成
Cycle Types	測定ステップごとの詳細なプログラムの設定
Variable Settings	変数入力方法の設定
Verification	作成メソッドの確認

↓

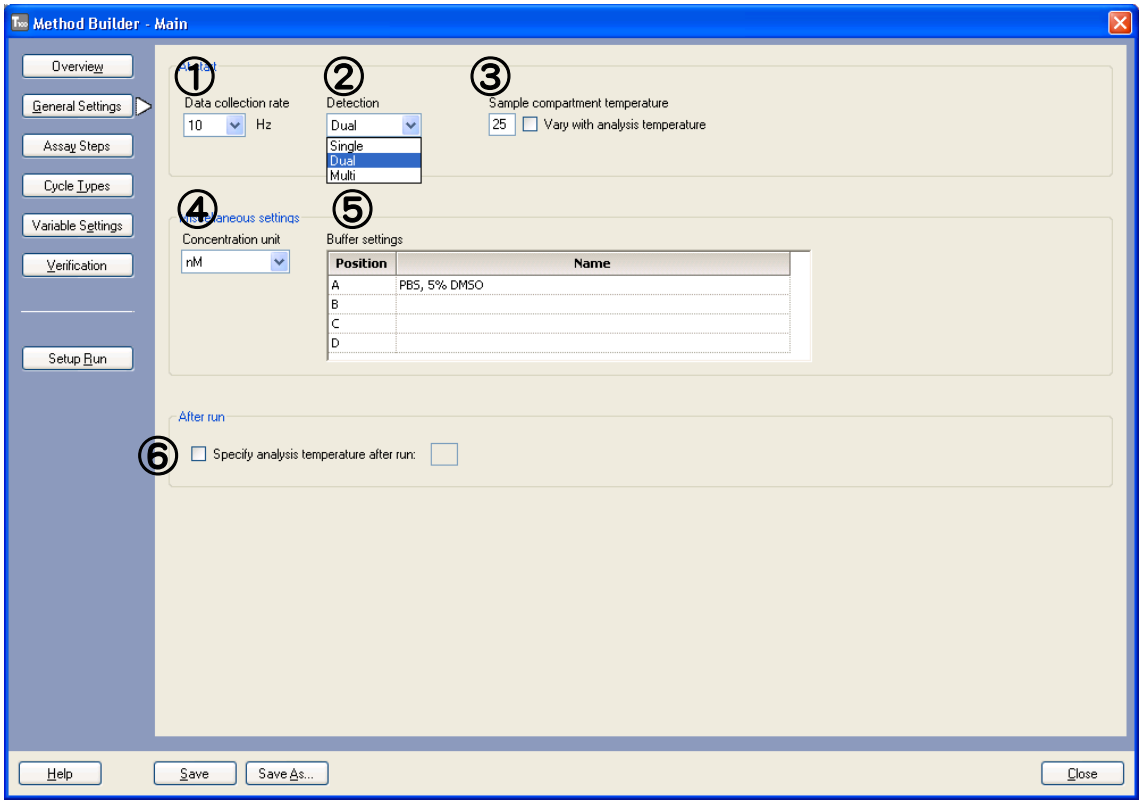
Overview をクリックします。



各項目をクリックすると、右側の画面で測定ステップの詳細を確認することができます。

↓

General settings をクリックします。



General settings では 6 項目を設定します。

① Data Collection rate

1Hz もしくは 10Hz を選択します。

反応速度定数、熱力学パラメータ算出の場合	10Hz
それ以外の実験目的の場合	1Hz

② Detection

流したいフローセルに対応した検出モードを以下の 3 つ（Single, Dual, Multi）から選択します。

Single	1、2、3、4
Dual	1,2、3,4、2-1、4-3
Multi	1,2,3,4、2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

③ Sample compartment temperature

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定します。サンプルコンパートメントの温度は、サンプルの安定性を考慮し、10℃程度に設定することもありますが、DMSO を含むサンプルの場合は、低温で析出することがあるので注意が必要です。

Vary with analysis temperature

Analysis temperature と同じ温度に設定したい場合にチェックを入れます。

④ Concentration unit

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択します。

⑤ Buffer settings

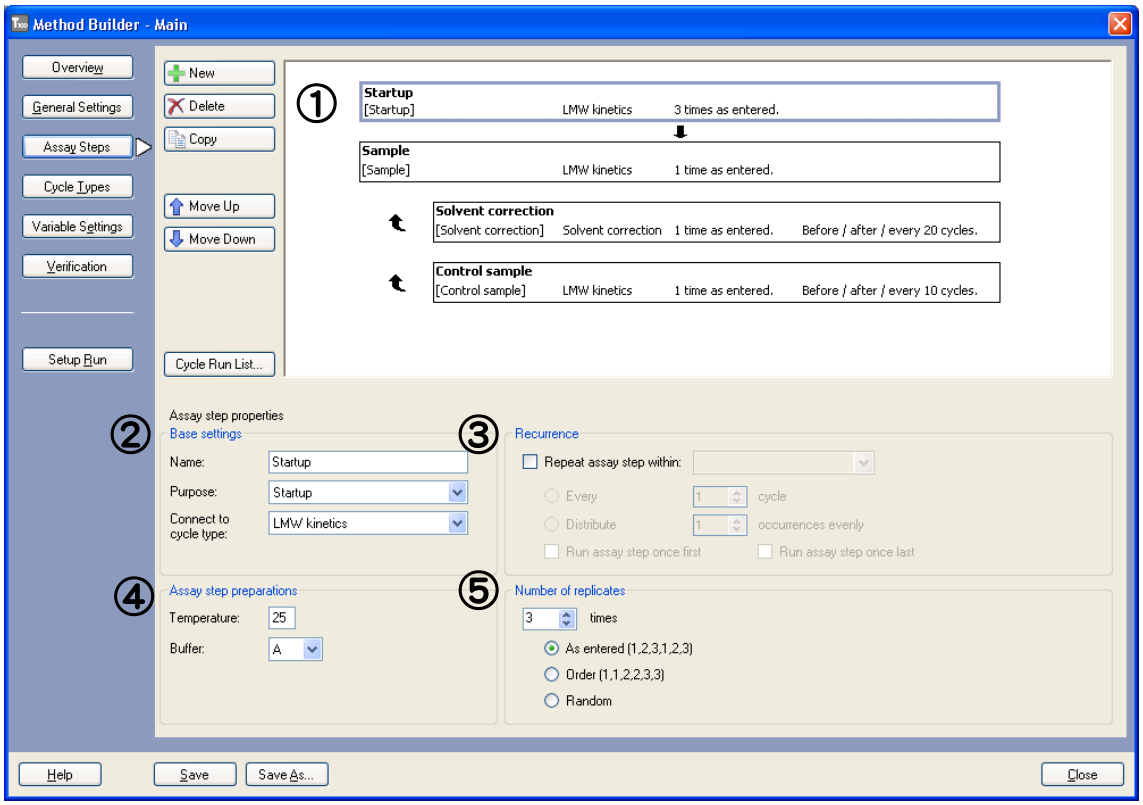
使用するランニング緩衝液名を入力しておくと、記録として残すことができます。

⑥ After run

この項目にチェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更されます。

↓

Assay steps をクリックします。

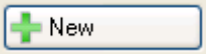


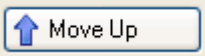
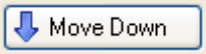
Assay steps では 5 つの設定項目があります。アッセイを正しく構築するためには、①、②および③の理解が必須です。

編集したい測定ステップをクリックし、各項目を設定します。

① Assay Steps

測定ステップの作成と各測定ステップの配置を変更します。

測定ステップを追加する場合は **New** （  ） から作成できます。新規で作成する測定ステップは、後述する **Purpose** と **Cycle type** の関連づけが必要です。詳細は、補足 6-3. を参照してください。

各測定ステップの配置は **Move Up** （  ） および **Move Down** （  ） にて調整します。測定ステップを削除したい場合には、該当の測定サイクルを選択後、**Delete** （ ） をクリックします。

② Base settings

Name　測定ステップの名称を入力します。最初は **Purpose** の名称と同一ですが、変更することも可能です。

Purpose

各測定ステップを“何のために”実行するか設定します。Evaluationsoftware において各測定ステップを適切に認識するために必要かつ重要な項目です。以下の 7 種類があります。

Conditioning	**Startup**
Solvent correction	**Calibration**
Sample	**Control Sample**
Undefined	

Connect to cycle type

Cycle types 画面で定義したサイクルタイプを関連づけます。サイクルタイプはプルダウンメニューに一覧で表示されます。サイクルタイプに関しては、後述する該当項目を参照してください。ウィザードで作成したプログラムを使用する場合は、適切に関連づけられているので、新規のアッセイステップを追加しない限り、特に設定を変更する必要はありません。

③ Recurrence

Calibration、Control Sample、Solvent correction などをサンプル測定ステップ内で定期的に繰り返し実行するための設定項目です。通常、ウィザードで作成したプログラムを読み込んだ場合はすでに設定されています。必要があれば測定頻度の変更や、サンプル測定ステップの最初と最後に測定する項目を追加できます。詳細は、補足 6-1. を参照してください。

④ Assay step preparations

温度の入力し、ランニング緩衝液を選択します。ランニング緩衝液を 1 種類しか使用しない場合は設定する必要はありません。（デフォルトでは、A が選択されています）

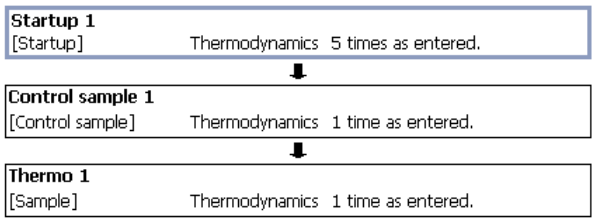
⑤ Number of replicates

同一サンプル（コントロールサンプルや検量線用試薬も同じ）について繰り返し測定回数を入力します。合わせて、測定順序を **As Entered**、**Order** および **Random** の中から選択します。

↓

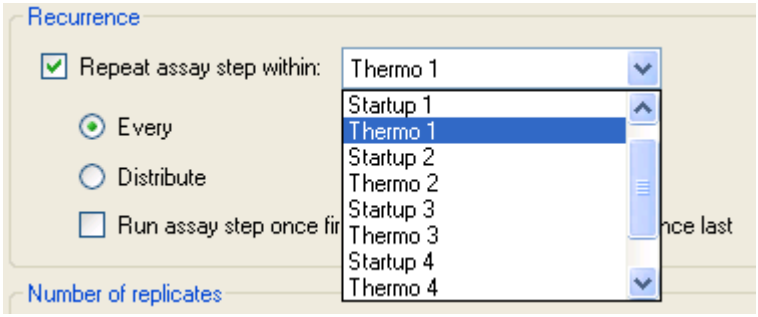
補足 6-1. 測定ステップの定期的繰り返しの実行設定

各ステップは（⇩）の入力順に実行されます。

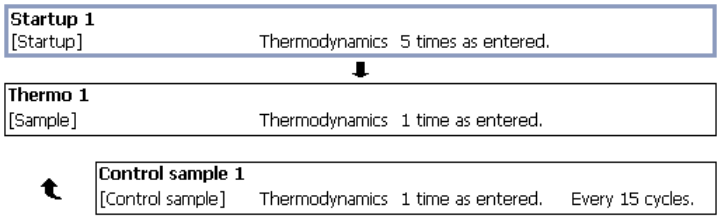


上記画面では、スタートアップ（Startup 1）が実行された後、コントロールサンプル（Control Sample 1）の測定ステップを実施します。終了後、解析に必要なサンプルの測定ステップ（Thermo 1）が実行されます。ここで、コントロールサンプルの測定をサンプル測定中に定期的に繰り返し実行したい場合には、**Recurrence** を設定します。

Control Sample に該当するステップ（Control Sample 1）を選択します。



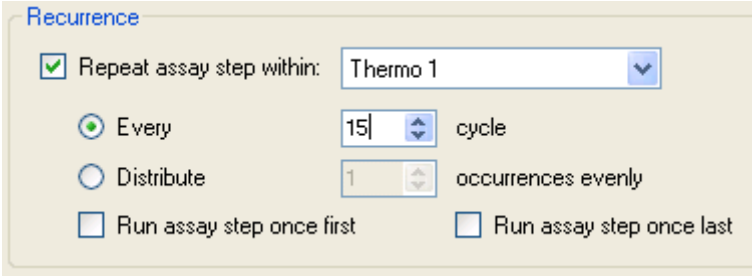
Repeat assay step within にチェックを入れ、どの測定ステップの中で定期的に測定を実行するかを右側のプルダウンメニューから選択します（アッセイステップ内のすべての測定ステップが表示されます）。通常、コントロールサンプルの測定や溶媒補正用曲線の測定はサンプル測定ステップ内（ここでは Thermo 1）です。



矢印（ は差し込み測定を表しており、矢印が向かっているステップ（ここでは Thermo 1）の中で実行されます。

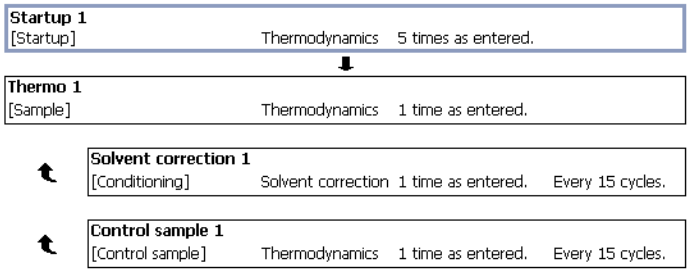
測定頻度に関しては、**Every** もしくは **Distribute** にチェックを入れて適切な数値を入力します。必要に応じて、**Run assay step once first**（矢印が向かっている先のステップが開始さ

れる直前に実施）および **Run assay step once first**（矢印が向かっている先のステップが終了した後に実施）にチェックを入れます。



間隔の確認に関しては、**Cycle Run List** 機能を使います。使用方法は、補足 6-2. を参照してください。

なお、測定ステップが複数存在する場合は、上から並んだ順に実行されます。必要に応じて、**Move Up** および **Move Down** を用いて並び替えます。

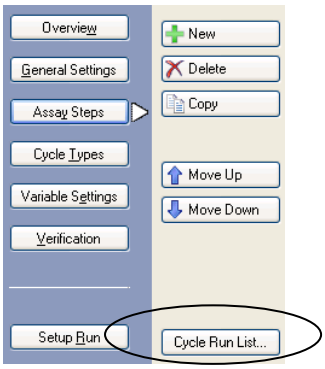


上に示した例では、アナライトが 30 サンプルの場合、以下のように測定が実行されます。

↓ **Startup 1**
↓ **Solvent correction 1**
↓ **Control Sample 1**
↓ **Thermo 1**　　1 から 15 番目までのアナライト
↓ **Solvent correction 1**
↓ **Control Sample 1**
↓ **Thermo 1**　　16 から 30 番目のアナライト

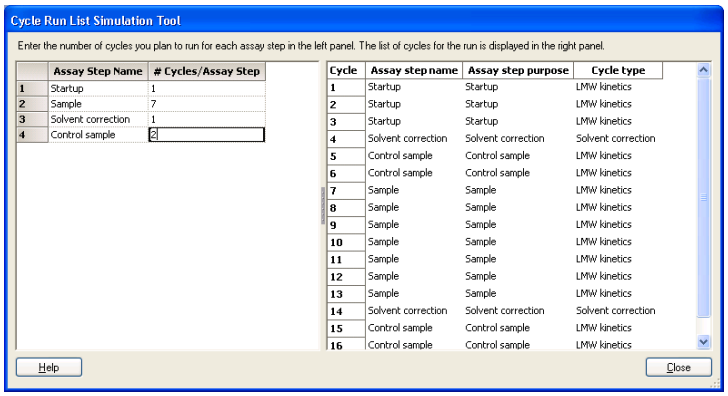
補足 6-2. サイクルの測定順序の確認と変更

サンプル測定ステップ内において、溶媒補正用曲線、コントロールサンプルなどはサンプル数に応じて複数回繰り返し実行します。繰り返し回数の設定は **Recurrence** および **Number of replicates** で設定します。実際にどの順序で溶媒補正用曲線、コントロールサンプルなどが実行されるか、アッセイステップを作成している際に **Cycle Run List...** で確認できます。

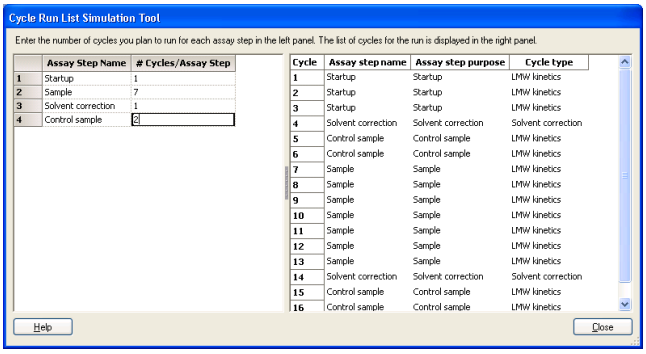


溶媒補正用曲線、コントロールサンプルなどのステップに関して **Recurrence** および **Number of replicates** を望みの間隔になるように値などを入力し、**Cycle Run List** をクリックします。

↓

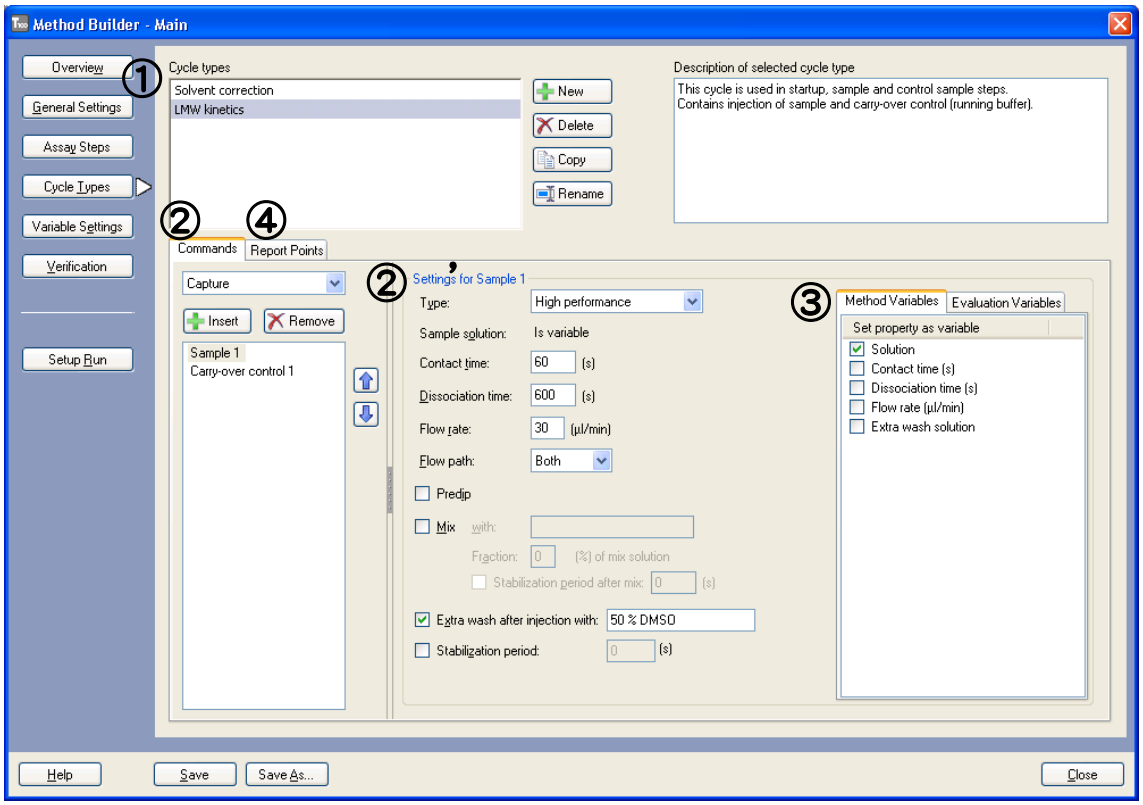

Cycle Run List Simulation Tool
Enter the number of cycles you plan to run for each assay step in the left panel. The list of cycles for the run is displayed in the right panel.
Assay Step Name
Cycles/Assay Step
1 Startup 1
2 Sample 7
3 Solvent correction 1
4 Control sample 2
Cycle
Assay step name
Assay step purpose
Cycle type
Help
Close

各ステップ名が表示されます。**# Cycles/Assay step** に、各ステップ内における測定サンプル数を入力します。例）**Startup** : 1、**Sample** : 7、**Solvent correction** : 1、**Control Sample** : 2


Cycle Run List Simulation Tool
Enter the number of cycles you plan to run for each assay step in the left panel. The list of cycles for the run is displayed in the right panel.
Assay Step Name
Cycles/Assay Step
1 Startup 1
2 Sample 7
3 Solvent correction 1
4 Control sample 2
Cycle
Assay step name
Assay step purpose
Cycle type
Help
Close

ウインドウ内の右側に測定サイクルの順番がリスト表示されます。望みの順序になるように、必要に応じて **Recurrence** および **Number of replicates** の設定を変更します。

Cycle types をクリックします。

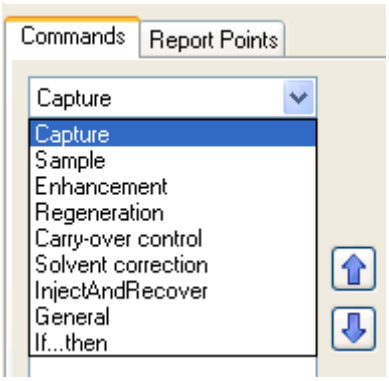


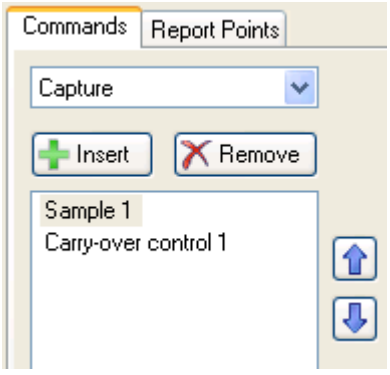
Cycle types では大きく分けて 4 つの設定項目があります。

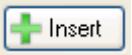
① サイクルタイプの作成、削除、名前の変更

ウィザードで作成したプログラムを読み込んでいる場合は、通常はここで新たなサイクルタイプを追加する必要はありません。作成法の詳細は、補足 6-3. を参照してください。

② 各サイクルのコマンドの設定およびパラメータの入力





各コマンドをプルダウンメニューから選択し、**Insert** （  ）をクリック

して追加します。各コマンドの順序は および にて調整します。各コマンドのパラメータは、右隣の画面②'で入力します。以下の 9 種類があります。
使用頻度が高いのは **Capture**、**Sample**、**Regeneration** です。中でも Sample は、Evaluation software で、反応速度定数や親和定数の算出および濃度測定などの解析を実行する際に必須なコマンドとなります。

Sample

測定サンプル（アナライト）の添加コマンドです。

Types:　添加モード

Low Sample consumption
サンプルの消費量が少なく、サンプル消費量は、7 mm プラスチックバイアル使用時、添加容量 + 28 µl です。

High performance
サンプル添加時の希釈が少なく、サンプル消費量は、7 mm プラスチックバイアル使用時、添加容量 + 58 µl です。主に、反応速度定数や解離定数の算出時に用います。

Single cycle kinetics
シングルサイクル法による反応速度定数や解離定数算出時に用います。最大 5 濃度までアナライトの連続添加が可能です。サンプル消費量は、7 mm プラスチックバイアル使用時、添加容量 + 58 µl です。

Sample solution:　デフォルトは Is variable です。

Contact time:　サンプル添加時間（s）を入力します。

Dissociation time:　解離時間（s）を入力します。シングルサイクル法では、最後に添加するサンプルの解離時間の設定となります。

Flow rate:　流速（µl/min）を入力します。

Flow path:　サンプル添加流路を選択します。
Detection を **Dual** に設定している場合、以下のフローセルにサンプルが流れます。必要に応じて選択します。
First　2-1 の場合は 1、4-3 の場合は 3

Second　2-1 の場合は 2、4-3 の場合は 4
Both　2-1 の場合は 1 および 2
4-3 の場合は 3 および 4
Detection を **Multi** に設定している場合は、該当するフローセル番号をプルダウンメニューから選択します。

Predip　サンプルを分取する前にニードルを洗浄する場合にチェックを入れるます。

Mix with:　サンプルを自動混合します。
各サンプルは指定された溶液と混合後に添加されます。
混合したい溶液の名称を入力します。**Fraction:**にサンプルおよび混合用溶液の“混合比”を入力します。
例えば 20（%）と入力すると、混合用溶液 20%とサンプル 80%が混合されます。混合後は、**Stabilization period after mix** に入力された時間が経過した後に添加されます。
阻害法を用いた濃度測定実験で使用します。なお、**Mix** 機能を使用する場合には必ず混合用のバイアルが必要です。

Extra wash after injection with:
サンプル添加後のフローセル以外の流路を洗浄する場合にチェックを入れます。洗浄溶液名を入力します。センサーチップ表面には流れません。

Stabilization period:　次のコマンド実行までの待機時間を設定する場合にチェックを入れます。待機時間（s）を入力します。

Capture
リガンドのキャプチャー用添加コマンドです。

Enhancement
アナライトの結合確認、またはシグナル増幅として 2 次抗体などを添加するコマンドです。

Regeneration

再生溶液の添加コマンドです。粘性が高い溶液（40% グリセロール以上）を使用する場合は、**High viscosity solution** にチェックを入れます。

Carry-over control

キャリーオーバーチェックの添加コマンドです。

40 µl/min で 30 秒ランニング緩衝液を添加します。Evaluation Software で結合レスポンスからキャリーオーバーを評価します。低分子化合物をアナライトとして添加する場合は、測定サイクルの最後に実施することを推奨します。

Solvent correction

溶媒補正溶液の添加コマンドです。

30 µl/min で 30 秒溶媒補正溶液を添加します。溶媒補正溶液を添加する数だけ、コマンドを挿入します。

InjectAndRecover

結合したアナライトの回収コマンドです。

General

Sample コマンドと同等の機能を持ちますが、添加モードに **Dual Inject** の機能が追加されています。**Dual Inject** は、1 つ目のサンプル添加終了後、ランニング緩衝液での自動洗浄をはさむことなく、引き続き 2 つ目のサンプルを添加することができます。ただし、General コマンドで実行したデータは解析できません。

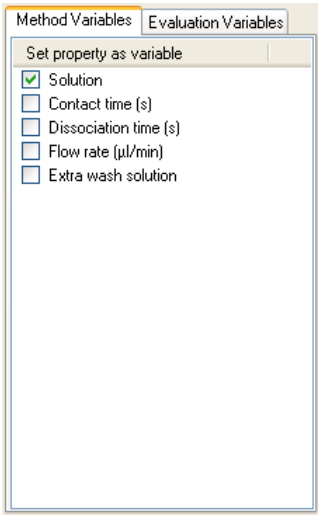
If...Then

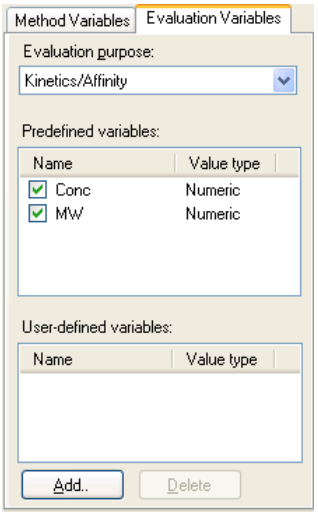
自動判断機能コマンドです。

取得したレポートポイントから、その次の操作コマンドの追加、省略、プログラム全体を終了させる設定が可能です。

③ 各測定サイクルの変数の設定

変数設定には、**Method Variables** と **Evaluation Variables** の 2 つがあります。





Method Variables

各測定サイクルのコマンドおよびパラメータの変数を設定できます。通常、サンプルコマンドの変数の設定は、Solution にチェックが入っています。測定サイクルごとに添加時間などを変数として設定する場合は、各項目にチェックを入れます。

Evaluation Variables

解析ソフトウェアに反映される変数の設定および解析目的を設定します。

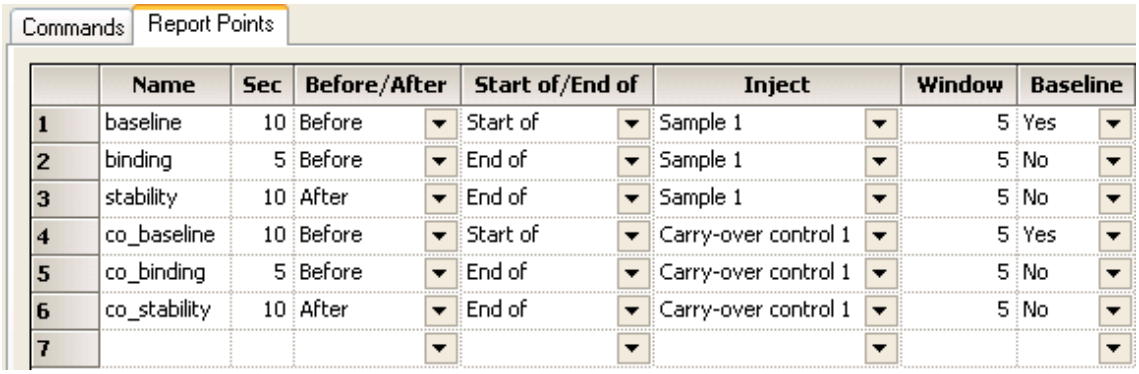
テンプレートのメソッドやウィザードで作成したプログラムを開いている場合、Evaluation purpose に応じて解析に必要な変数はあらかじめ設定されています。それらのチェックは外さないように注意します。チェックが入っていなくても測定自体は実行されますが、Evaluation software による解析は実行できません。

プログラムに定義されていないパラメータを作成する場合は、User defined variables 下の **Add...**をクリックし作成します。**Evaluation purpose** は、**Sample** コマンドの設定時のみ表示されます。**Evaluation purpose** には以下の 7 種類があります。

Kinetics/Affinity
Concentration
Kinetics – Heterogeneous analyte
General
Thermodynamics
Affinity in solution
Calibration – free conc

④ レポートポイントの編集

Report Points タブをクリックすると、各コマンドのレポートポイントの一覧を見ることができます。レポートポイントの追加方法は以下の通りです。


Commands | Report Points

	Name	Sec	Before/After	Start of/End of	Inject	Window	Baseline
1	baseline	10	Before	Start of	Sample 1	5	Yes
2	binding	5	Before	End of	Sample 1	5	No
3	stability	10	After	End of	Sample 1	5	No
4	co_baseline	10	Before	Start of	Carry-over control 1	5	Yes
5	co_binding	5	Before	End of	Carry-over control 1	5	No
6	co_stability	10	After	End of	Carry-over control 1	5	No
7							

Name　レポートポイントの名称を入力します。

Sec　Start of / End of および Inject で定義されるイベントから何秒離れた時刻にレポートポイントを取るかを設定します。

Before / After　Start of / End of および Inject で定義されるイベントの前後どちら側にレポートポイントを取るかを設定します。

Start of / End of　Inject で定義されるイベントの開始時および終了時のどちらを基準点にするかを設定します。

Inject　取得したいレポートポイントと関連づけるイベントをプルダウンメニューから選択します。

Window　レポートポイントの値（RU）を算出するための時間幅を設定します。通常 5 秒です。指定した時間の平均値をレポートポイントとします。

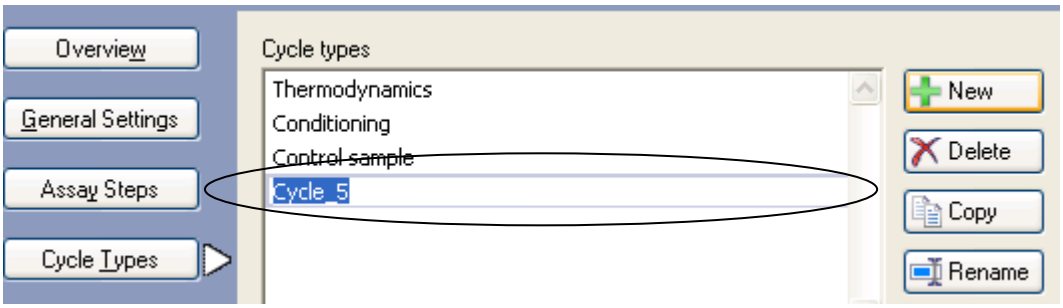
Baseline　該当するレポートポイントをベースライン（相対値 0）にするか設定します。

↓

補足 6-3. サイクルタイプおよびアッセイステップの追加

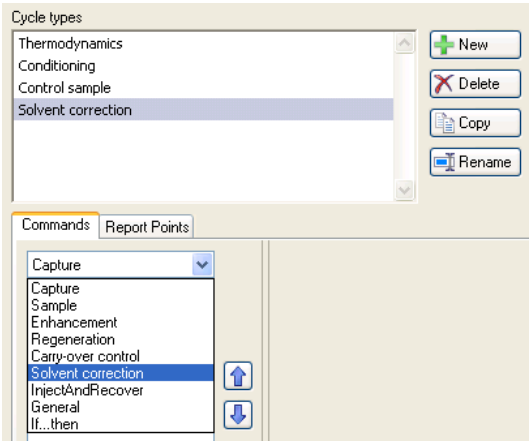
アッセイステップはそのメソッドに存在するいずれかのサイクルタイプと必ず関連づける必要があります。新規サイクルタイプの追加と、関連づける新規アッセイステップの追加の流れを示します。ここでは、低分子アナライト測定時に必要な溶媒補正用曲線の作成ステップ（Solvent correction）の追加を例として説明します。

Cycle types 画面にて **New** （ New ）をクリックします。



Rename で新規サイクルタイプの名称を入力します（ここでは **Solvent correction**）。

↓



Commands タブのプルダウンメニューから **Solvent correction** を選択して、**Insert** （ Insert ） をクリックします。

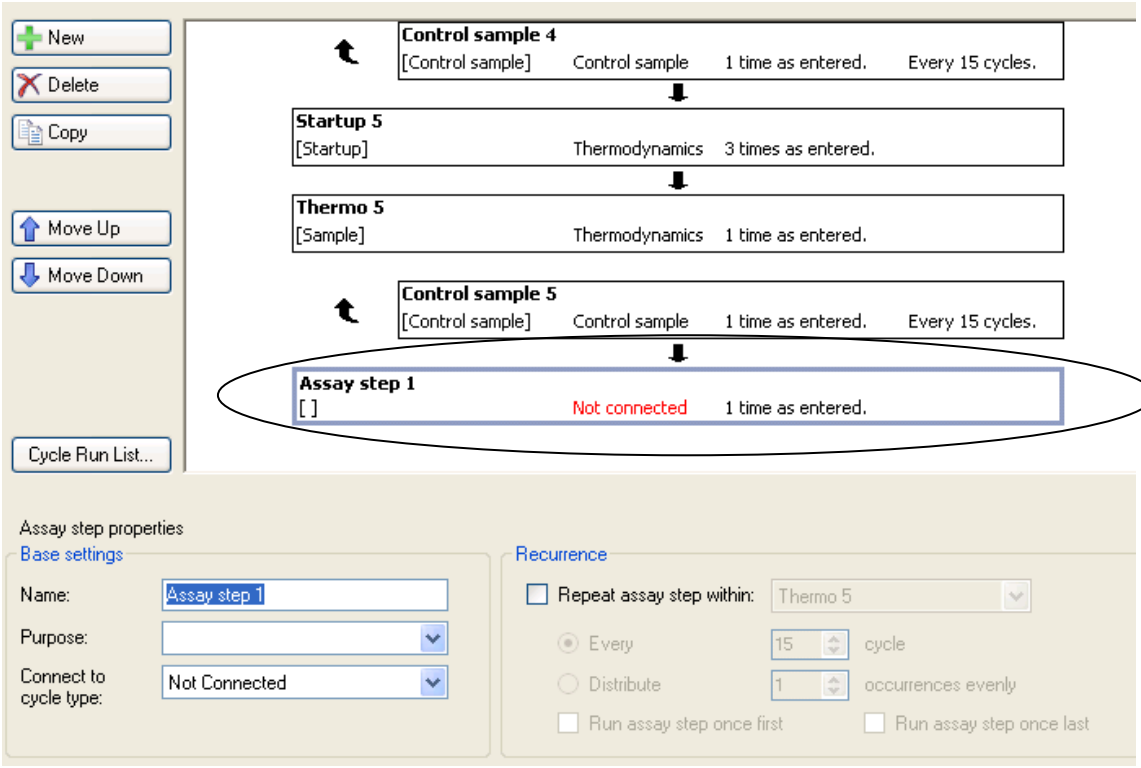
↓

溶媒補正溶液を添加する数だけコマンドを追加し、新規サイクルタイプを作成します。

続いて、**Solvent correction** のステップをアッセイステップに追加します。

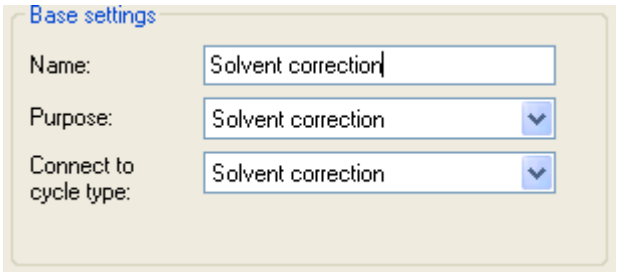
Assay steps ダイアログにて **New** （ New ）をクリックします。

↓



アッセイステップの最後尾に新規のステップ（ここでは **Assay step 1**）が挿入されます。Assay step 1 をクリックして選択し、**Base settings** の設定に移ります。

↓



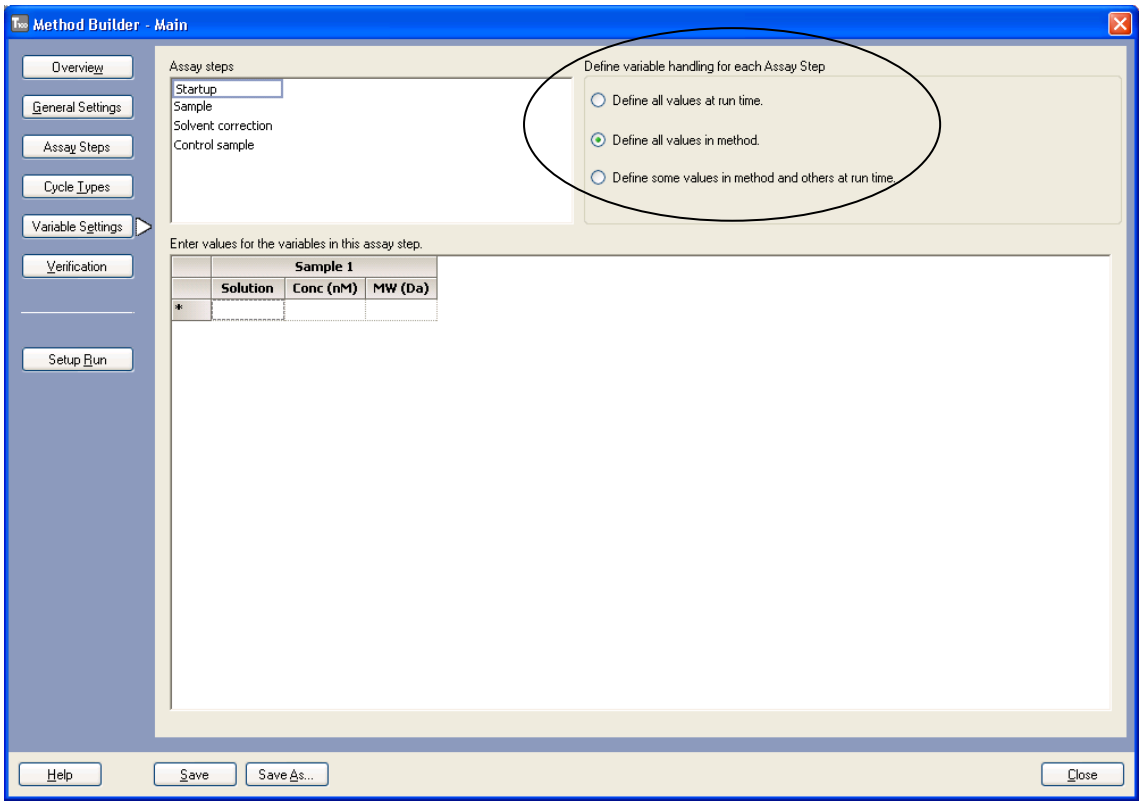
Name	Solvent correction
Purpose	Solvent correction
Connect to cycle type	Solvent correction

以上でステップの追加は完了です。

↓

追加したステップは必要に応じて **Recurrence**、**Number of replicates**、**Assay step preparations** を適切に設定します。

Variable Settings をクリックします。



各ステップの変数をどの時点で入力するのか、画面右上の 3 項目から選択します。

Define all values at run time

測定開始直前に入力するモードです。

Define all values in method

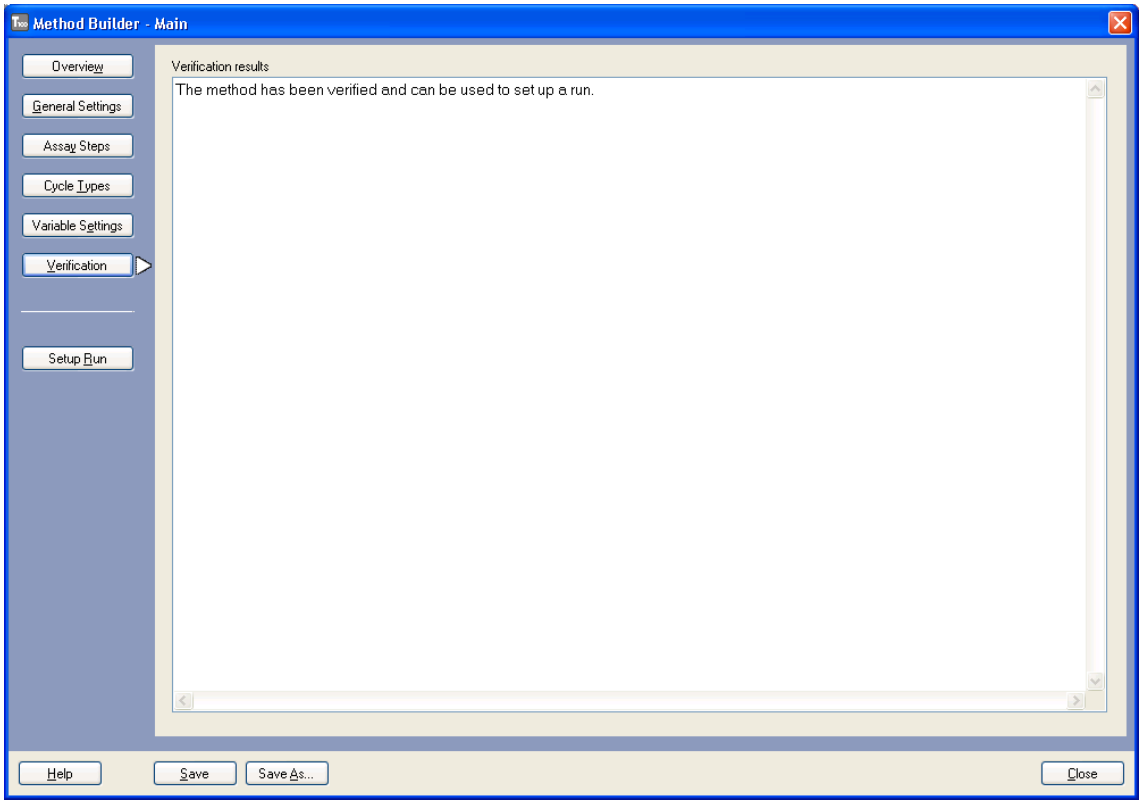
現画面上で入力するモードです。作成したメソッドを頻繁にテンプレートとして使用し、毎回変更がない場合は、ここで入力しておくと、測定直前での情報入力が不要となります。

Define some values in method and others at run time

幾つかの情報を現画面上で入力し、その他の情報は測定開始直前に入力するモードです。

↓

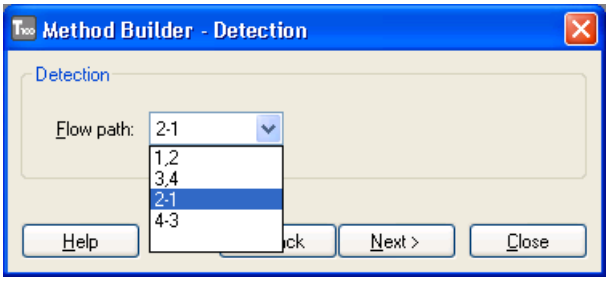
Verification をクリックします。



メソッドの設定に不備が無ければ“**The method has been verified and can be used to set up a run.**”と表示されます。間違いがある場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正します。

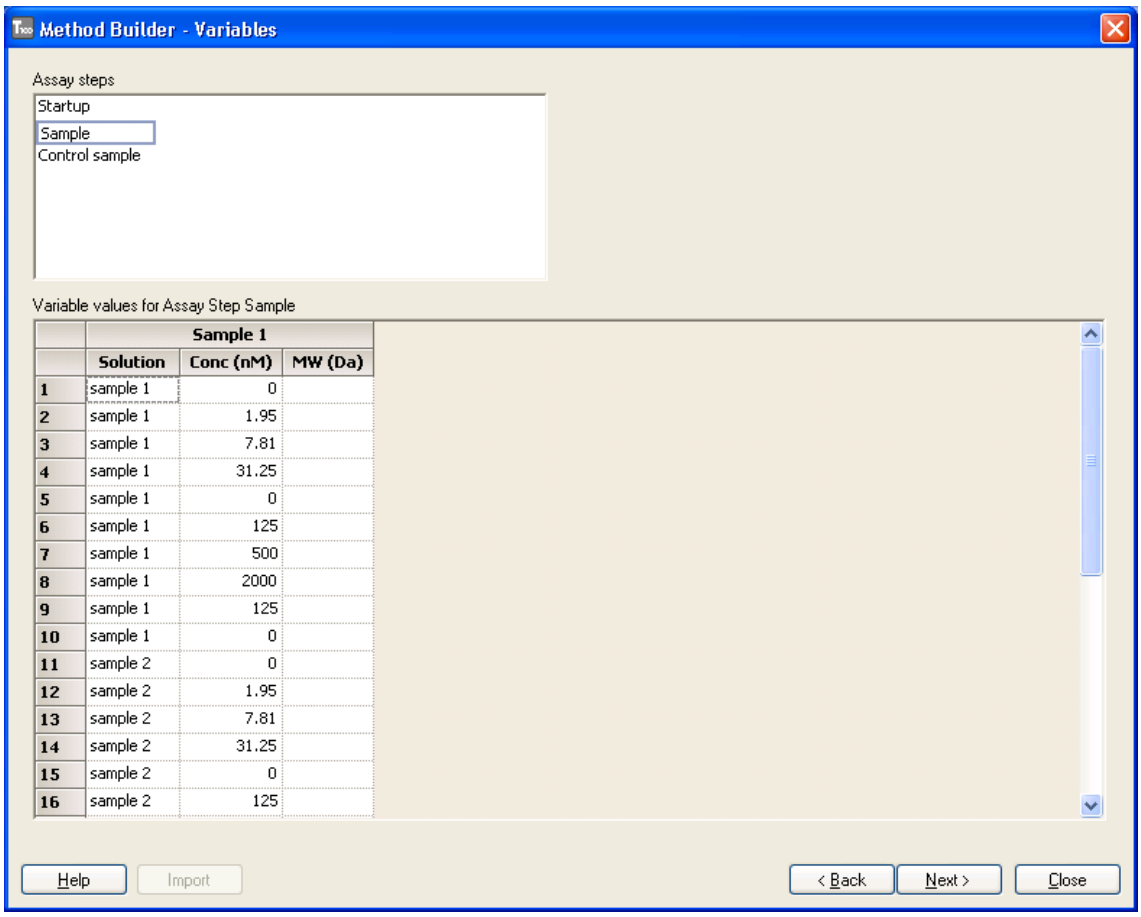
確認後、**Setup Run** をクリックします。

↓



適切な **Flow path** を選択し、**Next** をクリックします。

↓



Sample & Assay Setup のすべてのステップについて必要事項を入力します。

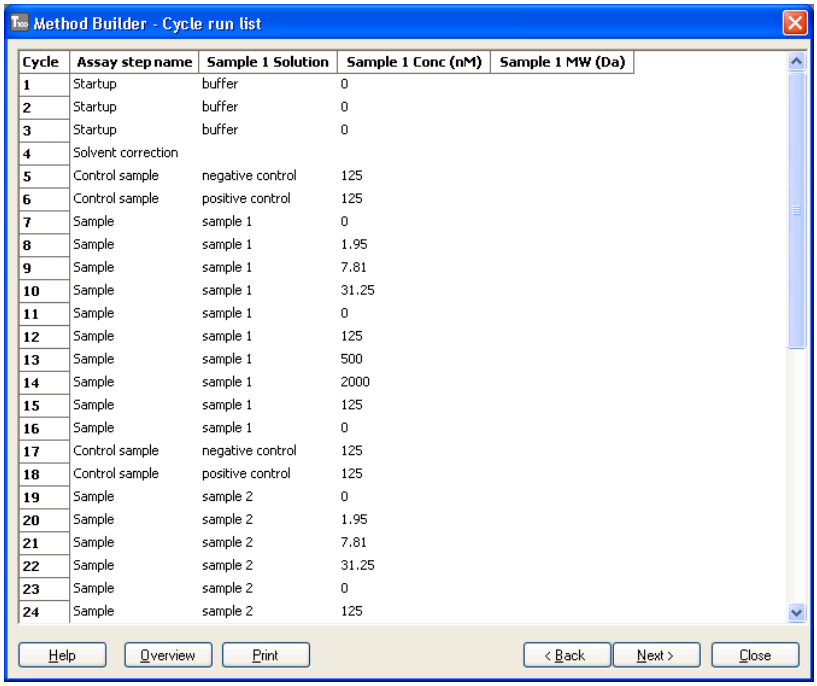
“**Define all values at run time**”を選択したステップは、この時点でサンプル情報の入力が必要となります。各ステップをクリックすると、画面下にサンプル情報が入力できるようになります。入力する必要のないカラムが出てきた場合は、空欄のまま次に進みます。

補足 6-4. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力します。

すべての項目を入力後、**Next >**をクリックします。

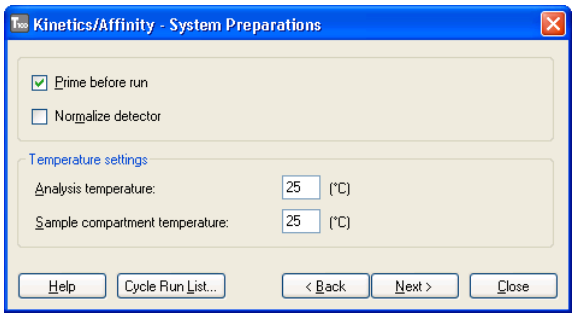
↓



Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (nM)	Sample 1 MW (Da)
1	Startup	buffer	0	
2	Startup	buffer	0	
3	Startup	buffer	0	
4	Solvent correction			
5	Control sample	negative control	125	
6	Control sample	positive control	125	
7	Sample	sample 1	0	
8	Sample	sample 1	1.95	
9	Sample	sample 1	7.81	
10	Sample	sample 1	31.25	
11	Sample	sample 1	0	
12	Sample	sample 1	125	
13	Sample	sample 1	500	
14	Sample	sample 1	2000	
15	Sample	sample 1	125	
16	Sample	sample 1	0	
17	Control sample	negative control	125	
18	Control sample	positive control	125	
19	Sample	sample 2	0	
20	Sample	sample 2	1.95	
21	Sample	sample 2	7.81	
22	Sample	sample 2	31.25	
23	Sample	sample 2	0	
24	Sample	sample 2	125	

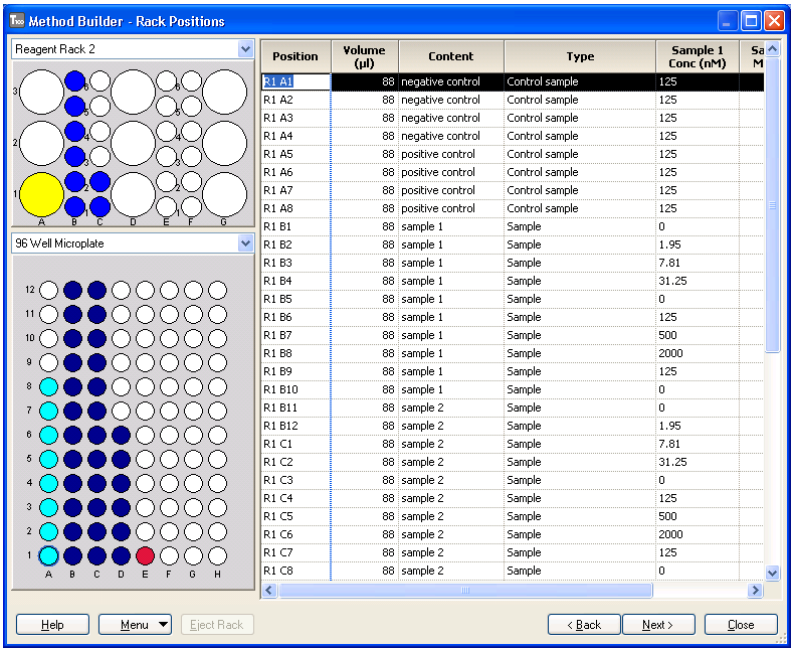
サイクルリストが表示されます。上から順番に測定が実行されます。
問題が無ければ、**Next >**をクリックします。

6-3. メソッドの実行



測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** を実施する場合はチェックを入れます。
設定後、**Next >**をクリックします。

↓



右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 6-5. サンプル位置の変更

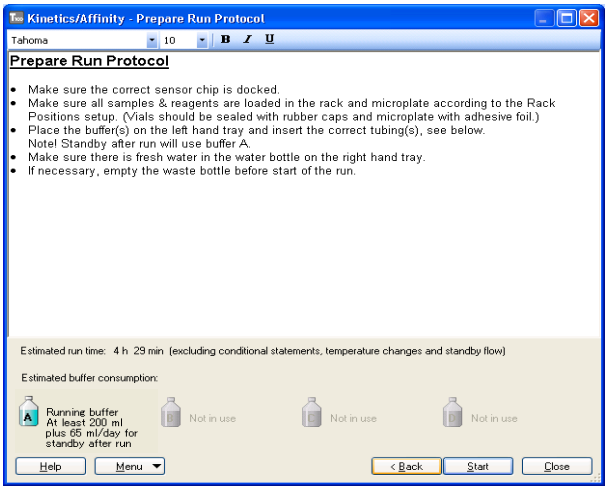
サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...**を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next** をクリックします。

↓


Kinetics/Affinity - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Notel Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 4 h 29 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
At least 200 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

測定時の基本的な共通注意事項と測定時間、必要なランニング緩衝液容量が表示されます。**Start** をクリックします。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかメッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定が開始します。

↓

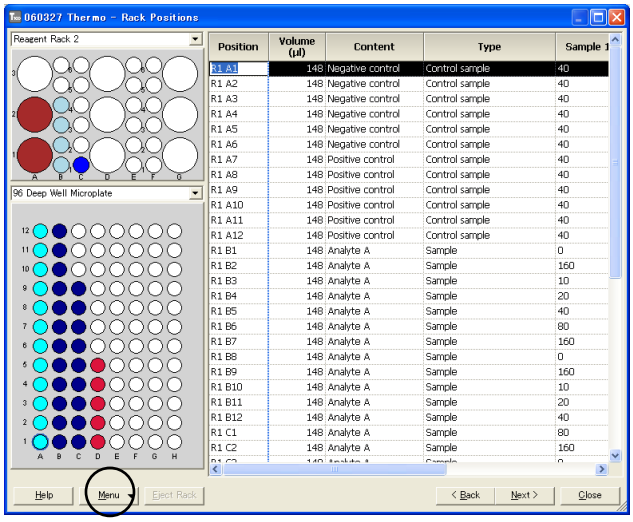
終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。
解析およびデータの評価は各章を参照してください。

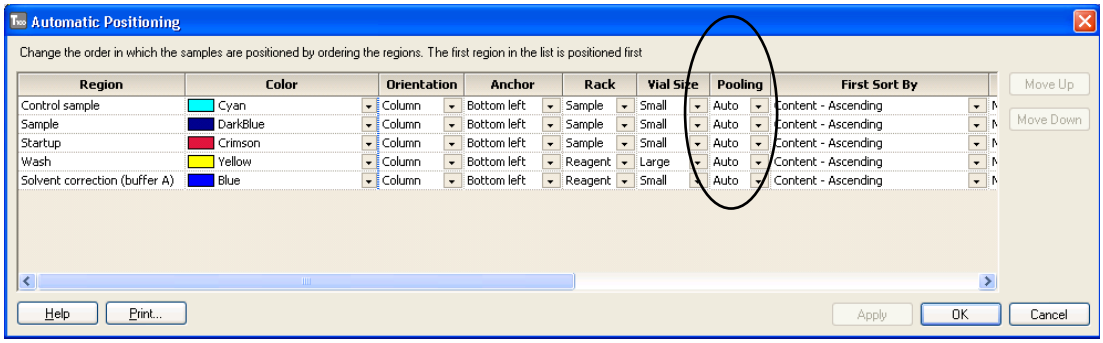
補足 6-6. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定が可能です。

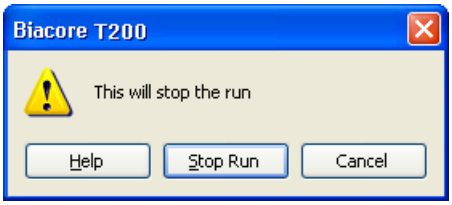
“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

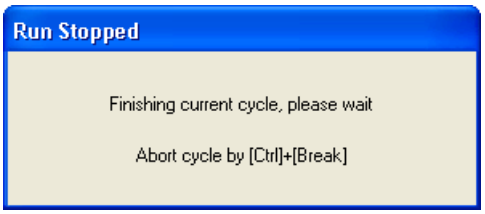
補足 6-7. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックします。



ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

7. メンテナンス

システム内部に設置されているマイクロ流路系（IFC）は消耗品であり、使用するサンプルの性状や使用頻度に応じて、耐久月数が異なります。**より長くマイクロ流路系を使用するために、システム使用ごとのメンテナンスの実施を推奨します。**

システムのメンテナンスは既定のメンテナンスプログラム（Menu bar の **Tools** → **More Tools...** → **Maintenance Tools...**）に従って実行します。

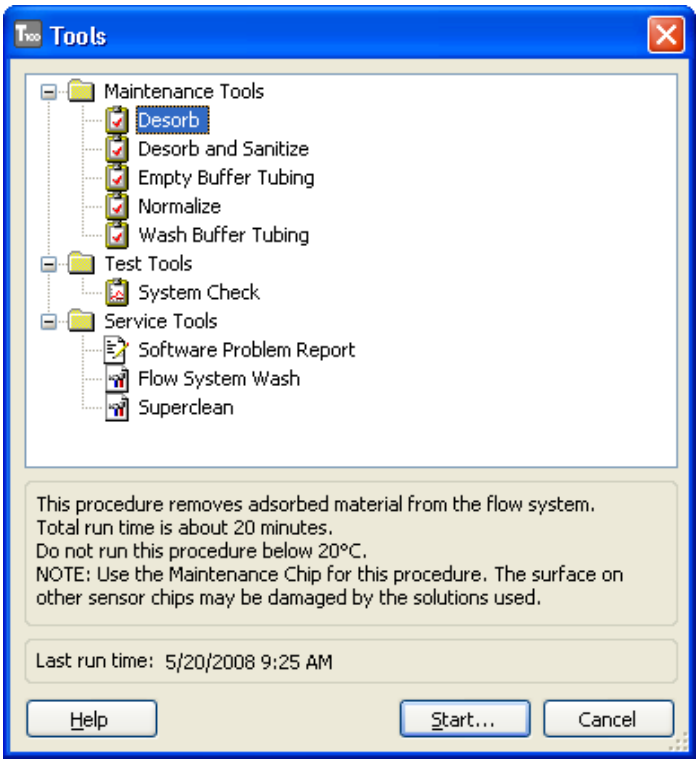
ランニング緩衝液として、超純水を使用します。また、メンテナンス時はメンテナンス用試薬によりセンサーチップ表面に固定化しているリガンドは破壊されてしまうので、必ず **Sensor Chip Maintenance**（もしくは使用済みセンサーチップ）を使用してください。
システム温度は、25℃に設定します。

メンテナンスコマンドの呼び出し

Menu bar の **Tools** → **More Tools...**を選択します。

↓

Tools ダイアログが表示されます。



各コマンドを選択すると、ウインドウ下で内容と最終実施日が確認できます。

メンテナンスに必要な試薬

通常のメンテナンスに必要な試薬は、Biacore Maintenance Kit, type 2 （BR-1006-51）に含まれています。

BIAdesorb solution 1		95 ml x 2
BIAdesorb solution 2		95 ml x 2
BIAtest solution		65 ml
BIAdisinfectant solution	（conc. ）	10 ml x 3
BIAnormalizing solution		90 ml
HBS-N Buffer		10 X 50 ml
Sensor Chip Maintenance		1 枚

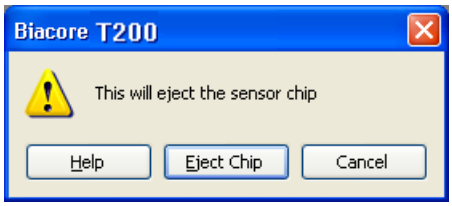
BIAdesorb solution 1 は 4 ℃で保存すると SDS が析出します。BIAdesorb solution 1 のみ室温で保存してください（その他のキット内試薬は、4 ℃で保存してください）。

Sensor Chip Maintenance は洗浄用チップです。
保存時には、埃が付着しないように、パラフィルムで巻いて室温で保存してください。再使用時には、ガラス面に汚れが付着していないことを確認してから Dock してください。また、定期的に新しいものに交換してください。

補足 7-1. メンテナンスチップへの交換方法

Toolbar の **Eject** アイコン（ ）または Menu bar の **Tools** → **Eject Chip...**を選択します。

↓

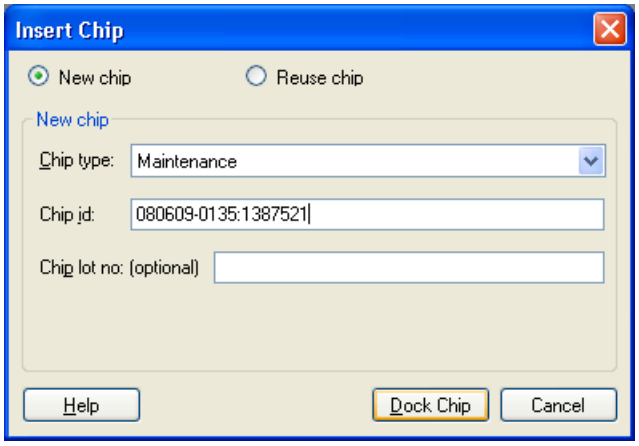


Eject Chip をクリックします。

↓

センサーチップポートが開くのでセンサーチップを取り出し、メンテナンス用センサーチップ（Sensor Chip Maintenance）をセットします。あわせて、ランニング緩衝液ボトルを超純水ボトルに交換します。

↓



Insert Chip ダイアログが表示されるので **Chip type: Maintenance** を選択後、**Chip id;**を入力し、**Dock Chip** をクリックします。

Dock が完了すると自動的に **Standby flow** 状態になります。

Dock 終了後は、超純水で **Prime** を実行します。

7-1. システムの洗浄

7-1-1. Desorb

IFC および、サンプルチューブに付着した汚れなどを洗浄するプログラムです。
1 週間に 1 回、必ず実施してください。実験内容の変更ごとに実施することを推奨します。
なお、クルードサンプルや不溶性サンプル使用時には、実験終了後に実施してください。
所要時間は、約 20 分です。測定温度および **Sample compartment** 温度は、20 ℃以上で実施してください。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）

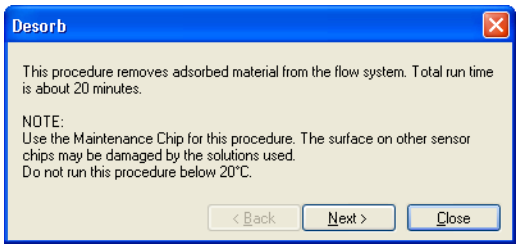
BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）

ランニング緩衝液

超純水

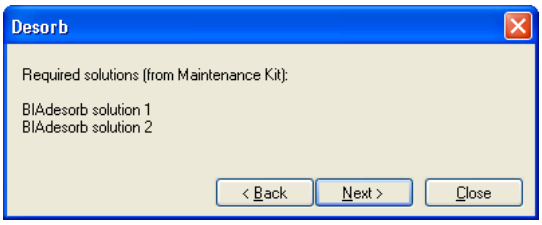
Tools → More Tools... → Maintenance Tools → Desorb を選択し **Start...**をクリックします。

↓


Desorb
This procedure removes adsorbed material from the flow system. Total run time is about 20 minutes.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next >**をクリックします。

↓



内容を確認後、**Next >**をクリックします。

↓

BIAdesorb solution 1 および、BIAdesorb solution 2 を、指示された量分注してラックにセットし、**Start** をクリックします。

↓

Desorb 終了後、装置は自動的に **Standby flow** の状態になります。そのままの状態で 3～4 時間放置するか、**Prime** を 3 回実施します。

7-1-2. Desorb and Sanitize

すべてのフローシステムの滅菌および洗浄するプログラムです。

1 ヶ月に 1 回、必ず実施してください。所要時間は、約 1 時間です。測定温度および **Sample compartment** 温度は、20 ℃以上で実施してください。

バッファーチューブ（チューブ A, B, C, D）の洗浄後、A 以外のチューブ（チューブ B, C, D）を空にして終了します。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）

BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）

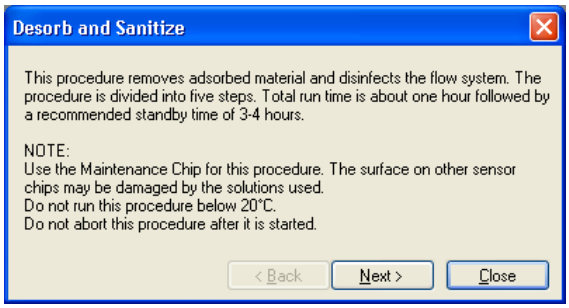
BIAdisinfectant solution　　原液 6 ml を超純水 80 ml で希釈

ランニング緩衝液

超純水

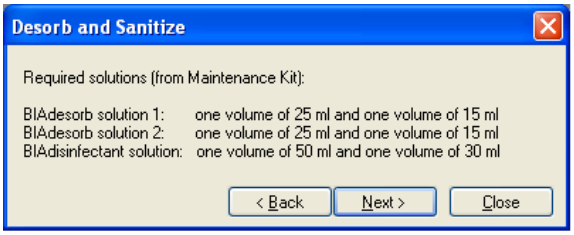
Maintenance Tools → **Desorb and Sanitize** を選択して **Start...**をクリックします。

↓


Desorb and Sanitize
This procedure removes adsorbed material and disinfects the flow system. The procedure is divided into five steps. Total run time is about one hour followed by a recommended standby time of 3-4 hours.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Do not abort this procedure after it is started.
< Back
Next >
Close

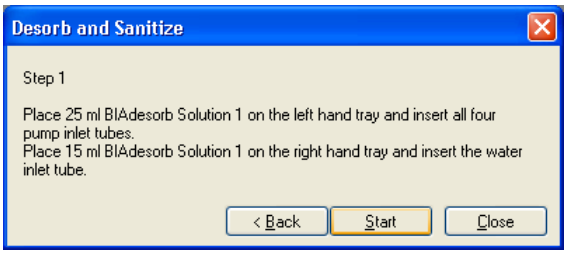
内容を確認後、**Next >**をクリックします。

↓


Desorb and Sanitize
Required solutions (from Maintenance Kit):
BIAdesorb solution 1: one volume of 25 ml and one volume of 15 ml
BIAdesorb solution 2: one volume of 25 ml and one volume of 15 ml
BIAdisinfectant solution: one volume of 50 ml and one volume of 30 ml
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next >**をクリックします。

↓


Desorb and Sanitize
Step 1
Place 25 ml BIAdesorb Solution 1 on the left hand tray and insert all four pump inlet tubes.
Place 15 ml BIAdesorb Solution 1 on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

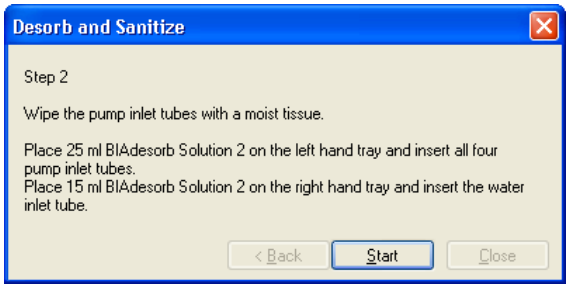
BIAdesorb Solution 1 を 25 ml, 15 ml の 2 本に分注します。

チューブ A, B, C, D は、すべて BIAdesorb Solution 1 ボトル（25 ml）にセットします。超純水チューブを、BIAdesorb Solution 1 ボトル（15 ml）にセットします。

Start をクリックします。

↓

ステップ 1 の終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示されます。


Desorb and Sanitize
Step 2
Wipe the pump inlet tubes with a moist tissue.
Place 25 ml BIAdesorb Solution 2 on the left hand tray and insert all four pump inlet tubes.
Place 15 ml BIAdesorb Solution 2 on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

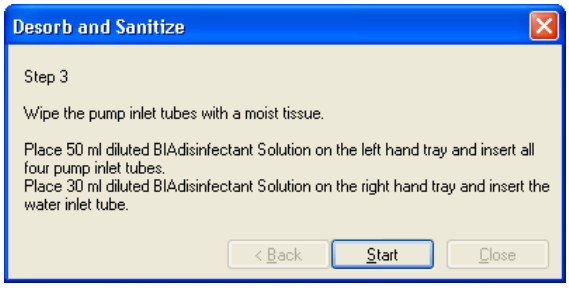
BIAdesorb Solution 2 を 25 ml, 15 ml の 2 本に分注する。

チューブ A, B, C, D は、すべて BIAdesorb Solution 2 ボトル（25 ml）にセットします。超純水チューブを、BIAdesorb Solution 2 ボトル（15 ml）にセットします。

Start をクリックします。

↓

ステップ 2 の終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示されます。

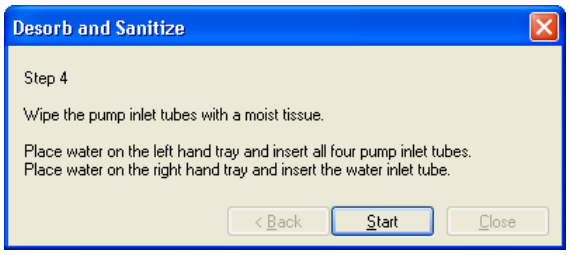

Desorb and Sanitize
Step 3
Wipe the pump inlet tubes with a moist tissue.
Place 50 ml diluted BIAdisinfectant Solution on the left hand tray and insert all four pump inlet tubes.
Place 30 ml diluted BIAdisinfectant Solution on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

BIAdisinfectant Solution を 50 ml, 30 ml の 2 本に分注します。

チューブ A, B, C, D は、すべて BIAdisinfectant Solution ボトル（50 ml）にセットします。超純水チューブを、BIAdisinfectant Solution ボトル（30 ml）にセットします。

Start をクリックします。

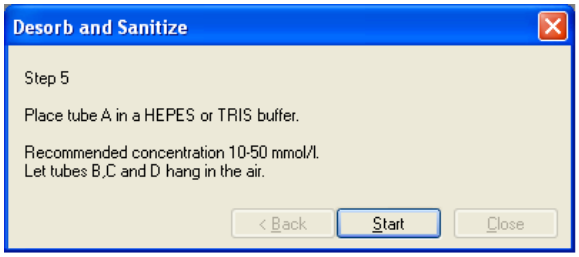
ステップ 3 の終了後、自動的にステップ 4 のダイアログが表示されます。



チューブ A, B, C, D は、すべて超純水ボトル（ランニング緩衝液ボトル）にセットします。
超純水チューブを、超純水ボトルにセットします。
Start をクリックします。

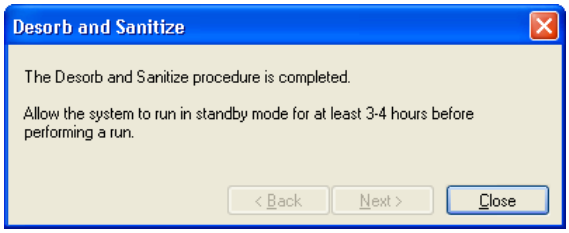
↓

ステップ 4 の終了後、自動的にステップ 5 のダイアログが表示されます。



チューブ A を緩衝液（10～50 mM HEPES や Tris 緩衝液）が入ったボトルにセットします。
チューブ B, C, D は、空気を吸えるようにボトルから取り出します。
Start をクリックします。

↓



ステップ 5 の終了後、装置は自動的に **Standby flow** の状態になります。この状態で 3～4 時間放置します。もしくは、Prime を 3 回実施します。

↓

Close をクリックして、洗浄を終了します。
電源を落とす場合には、超純水で Prime を実行してください。

なお、汚れがひどく Desorb and Sanitize で十分な洗浄効果が得られない場合には、Tools→More Tools→Service Tools の Superclean を実行してください。

7-1-3. Empty Buffer Tubing

B,C,D のバッファーチューブを超純水で洗浄後、チューブの中身を空にするプログラムです。Buffer scouting またはシステムチェックで B,C,D のチューブを使用後、使用する予定がない場合に実行します。所要時間は、約 20 分です。

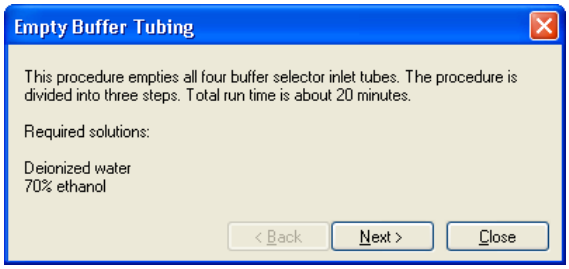
ランニング緩衝液

超純水

70%エタノール溶液

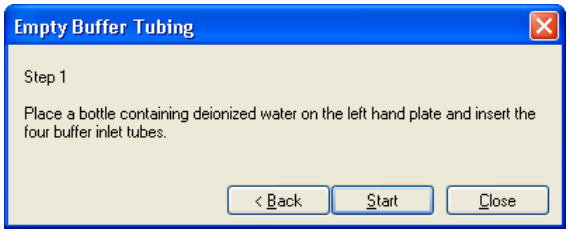
Tools → More Tools... → Maintenance Tools → Empty Buffer Tubing を選択し **Start...**をクリックします。

↓


Empty Buffer Tubing
This procedure empties all four buffer selector inlet tubes. The procedure is divided into three steps. Total run time is about 20 minutes.
Required solutions:
Deionized water
70% ethanol
< Back
Next >
Close

Next >をクリックします。

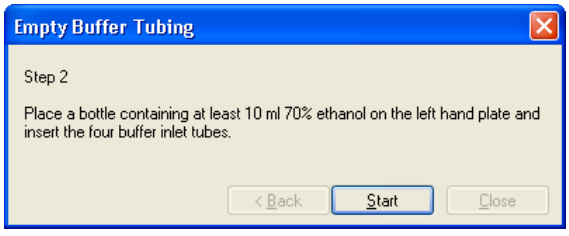
↓


Empty Buffer Tubing
Step 1
Place a bottle containing deionized water on the left hand plate and insert the four buffer inlet tubes.
< Back
Start
Close

本体左側のチューブ A,B,C,D をすべて超純水ボトルにセットします。**Start** をクリックします。

↓

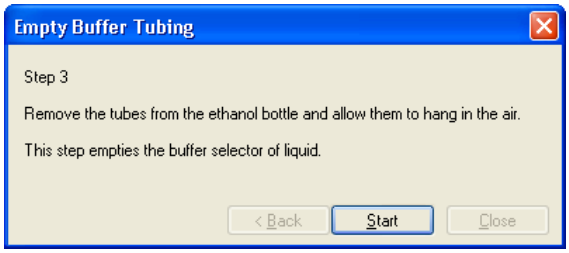
ステップ 1 終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示されます。


Empty Buffer Tubing
Step 2
Place a bottle containing at least 10 ml 70% ethanol on the left hand plate and insert the four buffer inlet tubes.
< Back
Start
Close

本体左側のチューブ A,B,C,D すべてを 70%エタノール溶液(10 ml)のボトルにセットします。**Start** をクリックします。

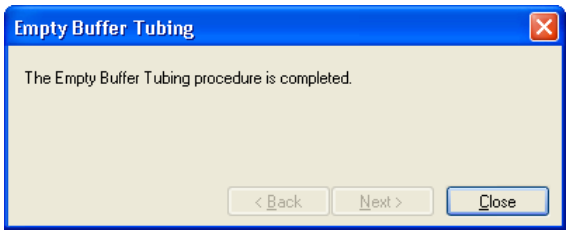
↓

ステップ 2 終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示されます。



本体左側のチューブ A,B,C,D を、空気が吸えるようボトルから出します。
Start をクリックします。

↓



Close をクリックします。B,C,D のチューブは、キムワイプで拭いて、チューブホルダーに収納してください。

7-1-4. Wash Buffer Tubing

A,B,C,D のバッファーチューブを洗浄するプログラムです。

界面活性剤または BSA など、吸着しやすい物質を含んだランニング緩衝液を使用後、それらの物質を含んでいないランニング緩衝液に切り替えて実験する場合に実行します。

所要時間は、約 30 分です。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）

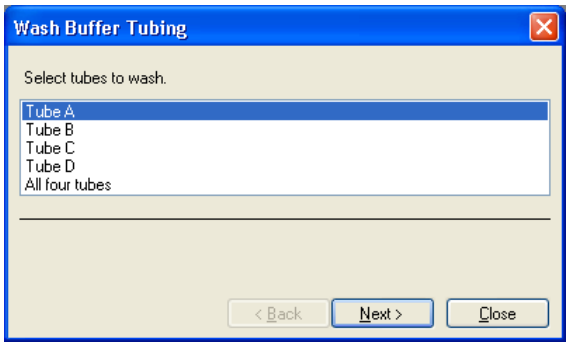
BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）

ランニング緩衝液

超純水

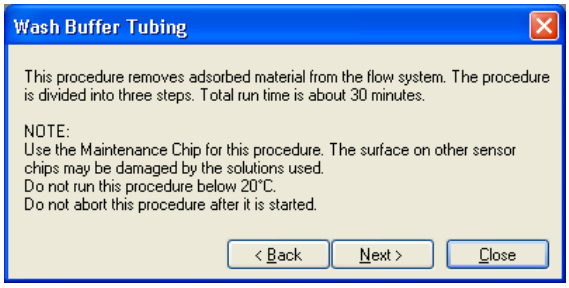
Tools → More Tools... → Maintenance Tools → Wash Buffer Tubing を選択し **Start...**をクリックします。

↓



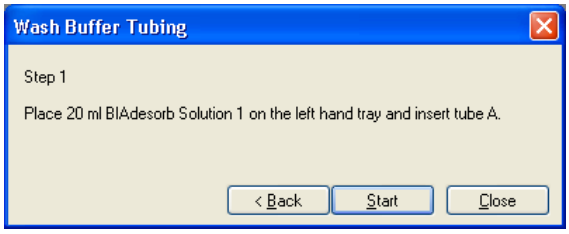
洗浄するチューブを選択し、**Next >**をクリックします。

↓


Wash Buffer Tubing
This procedure removes adsorbed material from the flow system. The procedure is divided into three steps. Total run time is about 30 minutes.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Do not abort this procedure after it is started.
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next >**をクリックします。

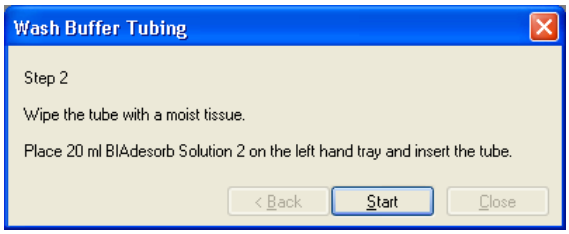
↓



最初に選択したチューブを BIAdesorb Solution 1（20 ml）ボトルに入れ、**Start** をクリックします。

↓

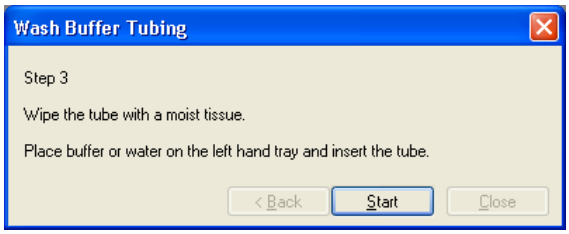
ステップ 1 終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示されます。



チューブを BIAdesorb Solution 2（20 ml）ボトルに入れ、**Start** をクリックします。

↓

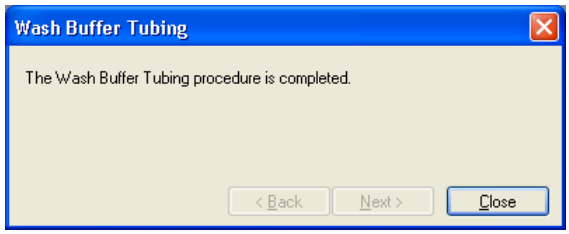
ステップ 2 終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示されます。



チューブを超純水ボトルに入れ、**Start** をクリックします。

↓

ステップ 3 終了後、自動的に以下のダイアログが表示されます。



Close をクリックします。

使用しないチューブはチューブホルダーに収納してください。

7-2. シグナルの校正

7-2-1. Normalize

センサーチップを新規にセットした際に実施することを推奨します。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

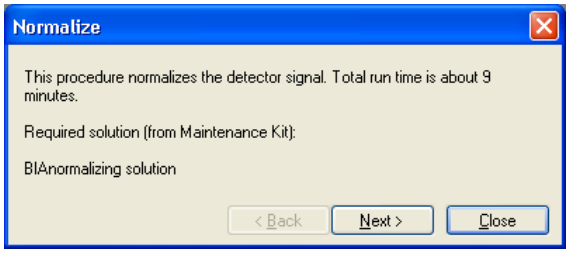
BIAnormalizing solution

センサーチップおよびランニング緩衝液

実験に使用するセンサーチップおよびランニング緩衝液

Tools → **More Tools...** → **Maintenance Tools...** → **Normalize** を選択し **Start...**をクリックします。

↓

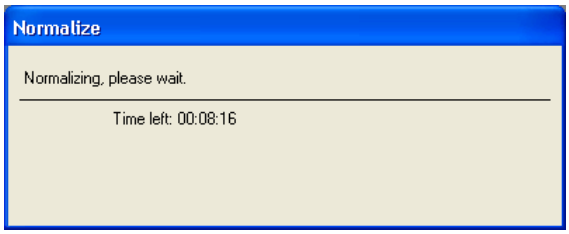

Normalize
This procedure normalizes the detector signal. Total run time is about 9 minutes.
Required solution (from Maintenance Kit):
BIAnormalizing solution
< Back
Next >
Close

Next >をクリックします。

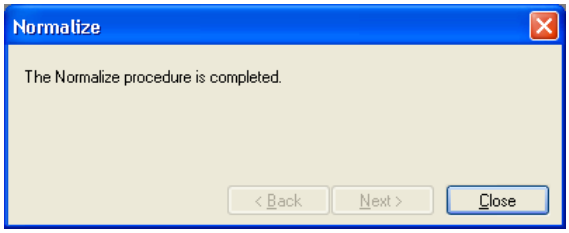
↓

バイアルをセット後、**Start** をクリックします。

↓



終了後、下記ダイアログが表示されます。



自動的に **Standby flow** 状態になります。

7-3. システムチェック

装置の診断をおこなうプログラムです。このプログラムは Desorb and Sanitize による洗浄後に実行してください。シグナルのドリフトや、エアースパイクの混入が激しい場合などに実施します。使用頻度が高い場合、定期的に実行することを推奨します。所要時間は、約 1 時間です。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAtest solution

ランニング緩衝液

HBS-N Buffer 150 ml 程度（メンテナンスキットの 10X Buffer を希釈して使用します）

超純水

必要な消耗品

新品の Series S Sensor Chip CM5　（チェック後、実験に使用可能）

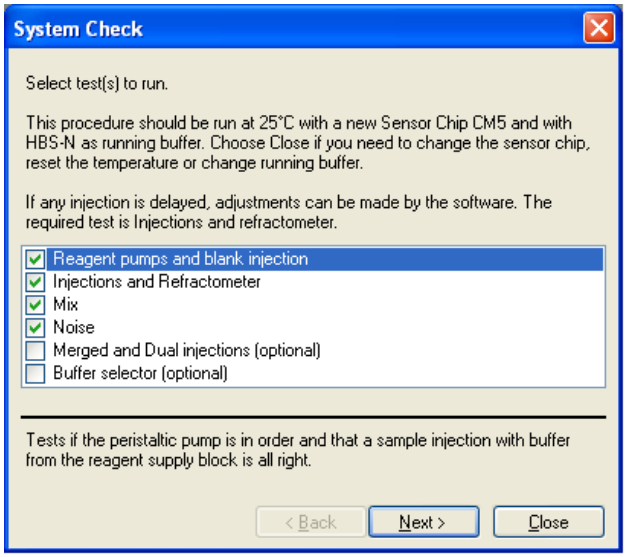
BIAtest solution

1.5 ml プラスチックバイアル

新品のセンサーチップ CM5 を Dock 後、HBS-N 緩衝液で Prime を実施します。

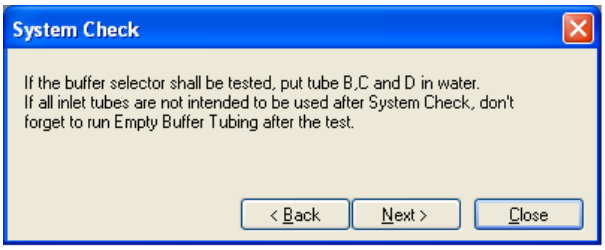
Tools → **More Tools...** → **Test Tools** → **System Check** を選択し **Start...**をクリックします。

↓


System Check
Select test(s) to run.
This procedure should be run at 25°C with a new Sensor Chip CM5 and with HBS-N as running buffer. Choose Close if you need to change the sensor chip, reset the temperature or change running buffer.
If any injection is delayed, adjustments can be made by the software. The required test is Injections and refractometer.
Reagent pumps and blank injection
Injections and Refractometer
Mix
Noise
Merged and Dual injections (optional)
Buffer selector (optional)
Tests if the peristaltic pump is in order and that a sample injection with buffer from the reagent supply block is all right.
< Back
Next >
Close

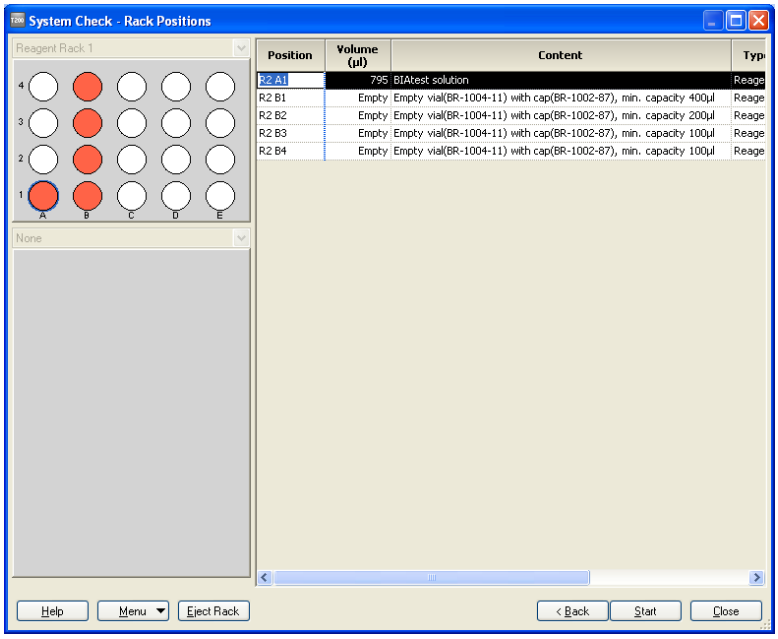
System Check ダイアログが表示されます。デフォルトでは、上から 4 項目が選択されています。**Next >**をクリックします。Merged and Dual injections および Buffer Selector を使用する場合にはチェックを入れます。

↓


System Check
If the buffer selector shall be tested, put tube B,C and D in water.
If all inlet tubes are not intended to be used after System Check, don't forget to run Empty Buffer Tubing after the test.
< Back
Next >
Close

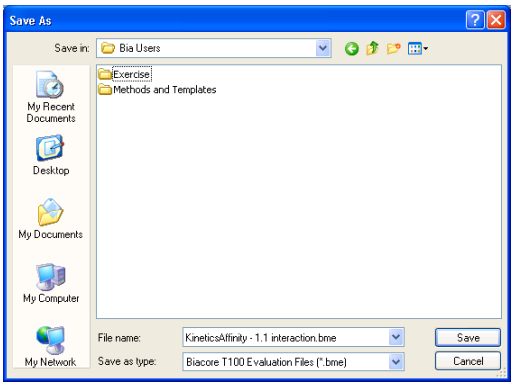
A のチューブを HBS-N Buffer ボトルに入れます。Buffer Selector テストを行う場合には、B,C および D のチューブを超純水の入ったボトルに差し込みます。（Buffer Selector テストが必要なければ、B,C,D のチューブを超純水ボトルに入れる必要はありません。）
Next >をクリックします。

↓



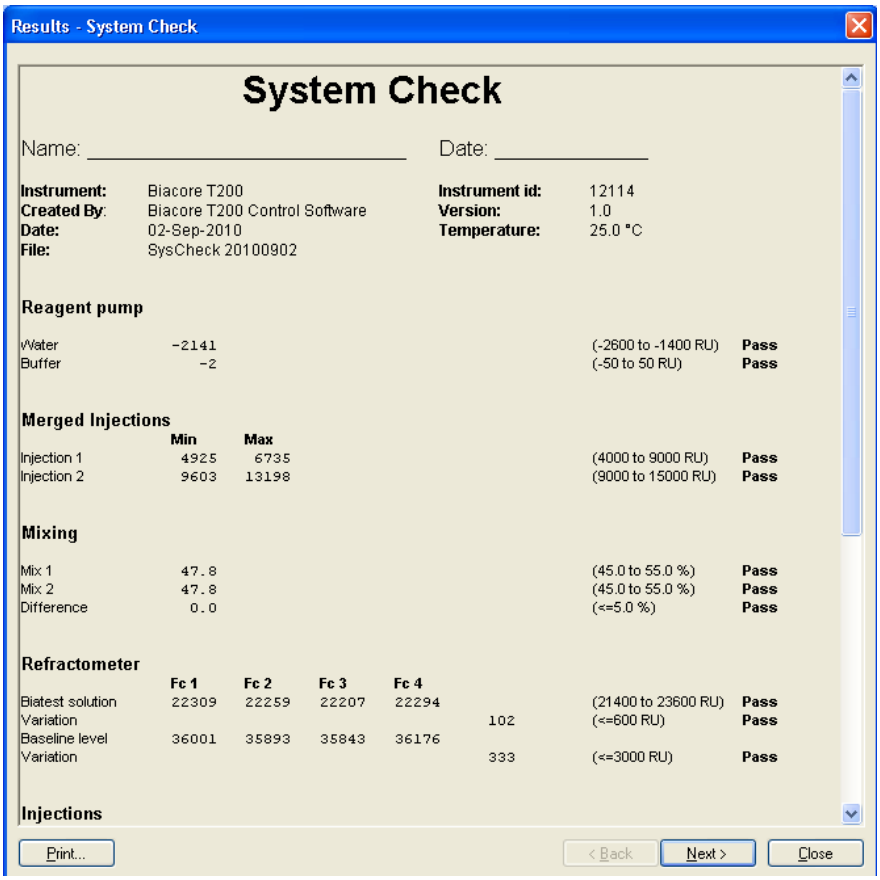
BIAtest Solution を、1.5 ml プラスチックバイアルに 795 µl 分注してラックポジションにセットします。また、空の 1.5 ml プラスチックバイアル 4 本を、キャップをして指定のラックポジションにセットします。Merged and Dual injections テストをおこなう場合には、BIAtest Solution を 995 µl と空バイアルを 7 本セットします。**Start** をクリックします。

↓



続いて、測定結果の保存先を指定します。**File name** を入力して、**Save** すると測定がスタートします。Buffer Selector テストを実施した場合で、システムチェックを実行後、B,C および D のチューブを使用しない場合は **Empty Buffer Tubing** を実行してください。

↓



測定が終了すると、チェック結果が自動的に表示されます。各チェック項目について測定値が正常範囲内であれば“**PASS**”、範囲外であれば“**FAIL**”と診断されます。**FAIL** が表示されている場合には弊社技術サービス部にご相談ください。

8. 実験の終了

実験が終了した際には、次のいずれかの方法でシステムを維持できます。

スタンバイ状態で放置　　7 日以内に使用する場合

電源を落として終了　　7 日以上使用しない場合

8-1. スタンバイ状態での放置

測定が終了すると、自動的に **Standby flow** 状態になります。

チューブ A にセットしたランニング緩衝液で、65 ml/ 24 時間の流速を最長 7 日間継続します。ランニングバッファーを涸らさないように注意してください。廃液ボトルの空き容量にも注意してください。

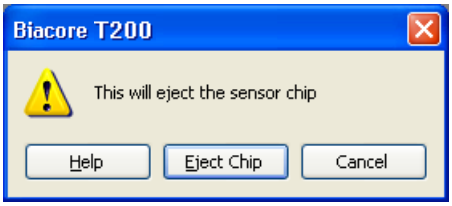
スタンバイ状態であるか否かは、ウインドウ下の **Status bar** で確認できます。

8-2. 電源の落とし方

電源を落とす前には、メンテナンスを実行してください。

Toolbar の **Eject** アイコン（ ）または Menu bar の **Tools** → **Eject Chip...**を選択します。

↓



Eject Chip をクリックします。

↓

センサーチップポートが開きます。センサーチップを取り出し、Biacore T200 control software を終了します。パソコンのシャットダウン、Biacore T200 の本体電源を落とします。

注意）電源を落とす場合は、システム内部が超純水で置き換わっているかどうか確認の上、電源を落としてください。

8-3. センサーチップの保存

取り出したセンサーチップは、以下の 2 つの方法で保存できます。
リガンドは保存中に変性する可能性があるので、再使用の際にはポジティブコントロールサンプルのレスポンスからリガンドの活性を確認してください。また、再 Dock 時前には、検出面、固定化面に埃などの汚れが付着していないことを確認してください。

ドライ状態での保存

取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて 4℃で保存します。
安定なサンプルを固定したセンサーチップの保存に用います。

ウェット状態での保存

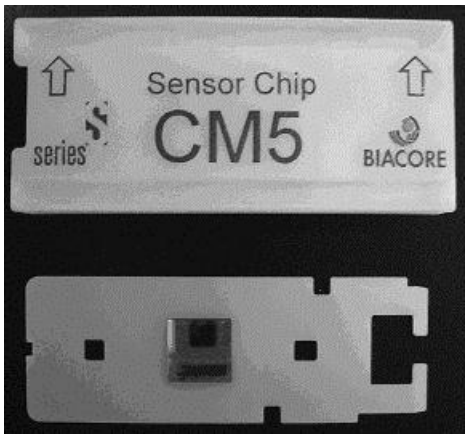
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを容器（50 ml 容のふた付きプラスチック遠心チューブ等）に分注した HBS-EP+などの緩衝液に浸し、4 ℃で保存します。

シートの取り出しと保存

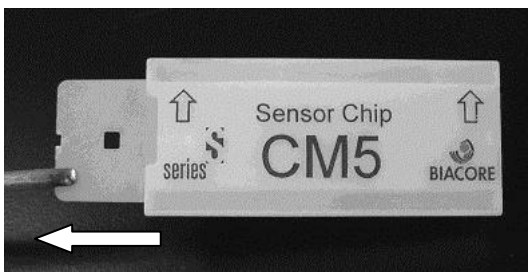
センサーチップはカバーとシートから構成されています。

カバー

シート



シートの金基板の窪んでいる面はリガンドが固定化されています。
平らな面は検出器が接触します。リガンド固定化面には触れないよう注意してください。下図のようにピンセットにてシートを抜き出し、緩衝液に浸して保存します。



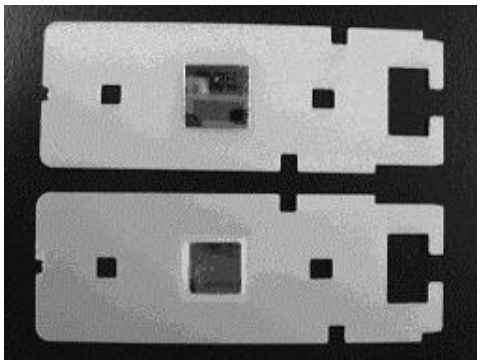
保存していたシートからの緩衝液成分の除去とカバーへの収納

再利用する際は、緩衝液に浸していたシートをカバーに収めます。シートの水分を取り除いてからカバーに収めてください。

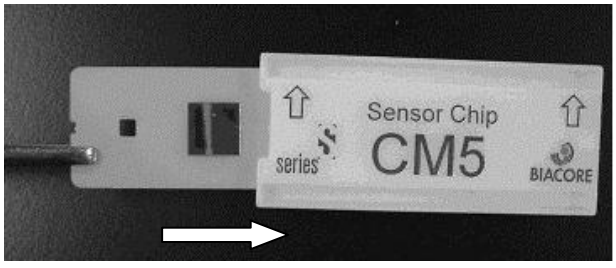
プラスチックの部分および検出面	キムワイプで拭き、超純水で湿らせたキムワイプで再度拭きます。さらに乾いたキムワイプで拭きます。
固定化面	キムワイプなどを“こより状”に細くして、金基板の中央部分に触れないように、四隅から水分を吸収します。

検出面

固定化面



埃に注意しながらカバーに収めます。下図のように、検出面が表になる向きで、ピンセットにてカバーの左側から挿入します。
リガンド固定化面を表にして挿入した場合には最後までシートが入りません。

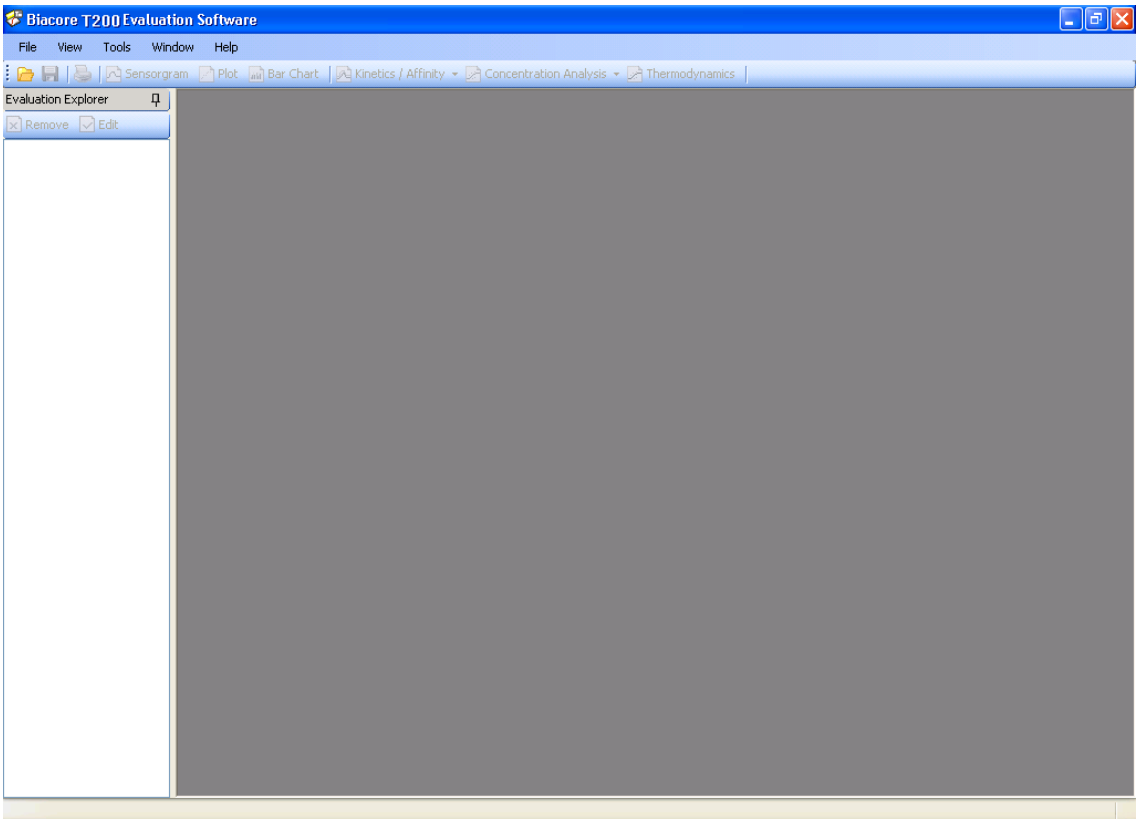


9. センサーグラムの編集

ウィザードまたはメソッドを用いた測定プログラム終了後、Biacore T200 Evaluation Software は自動的に立ち上がり、取得データが開かれます。過去に取得したデータを編集解析する場合は、Evaluation ソフトウェアを起動し、ファイルを呼び出してください。

9-1. ソフトウェアの起動

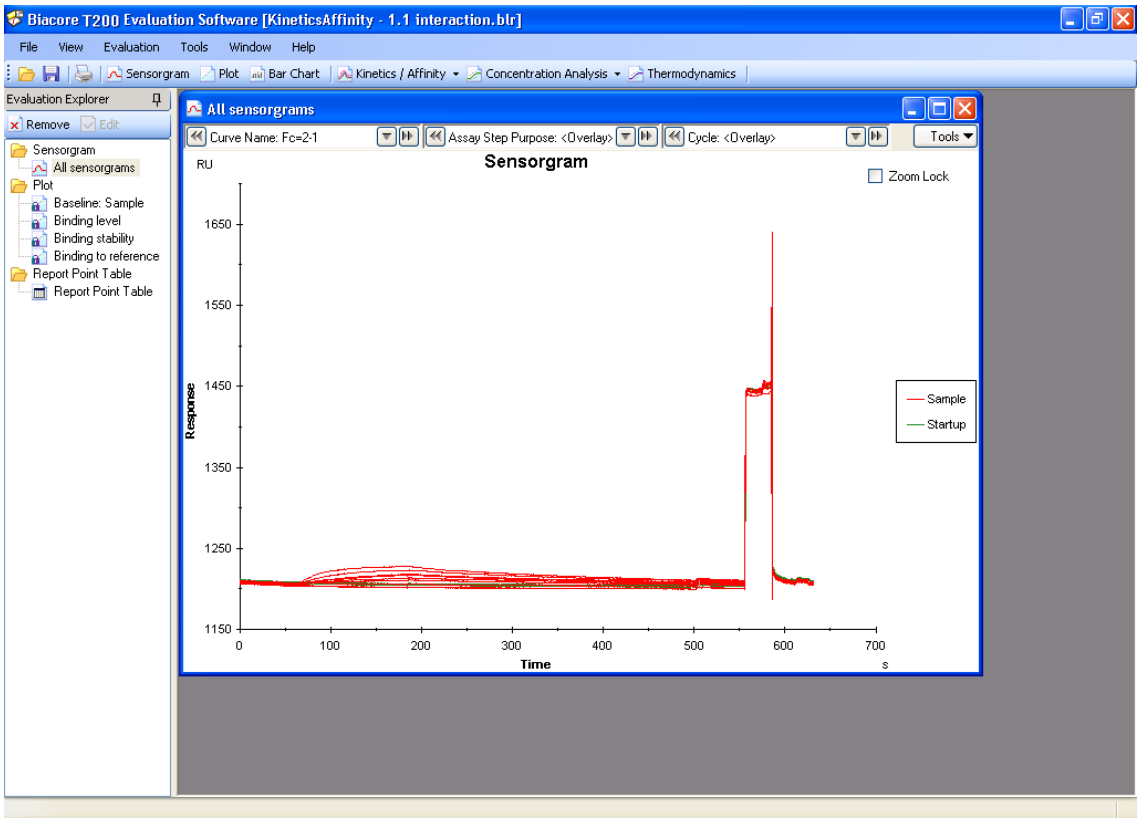
画面左下の **Start** → **All programs** → **Biacore** → **Biacore T200 Evaluation Software** をクリックします。



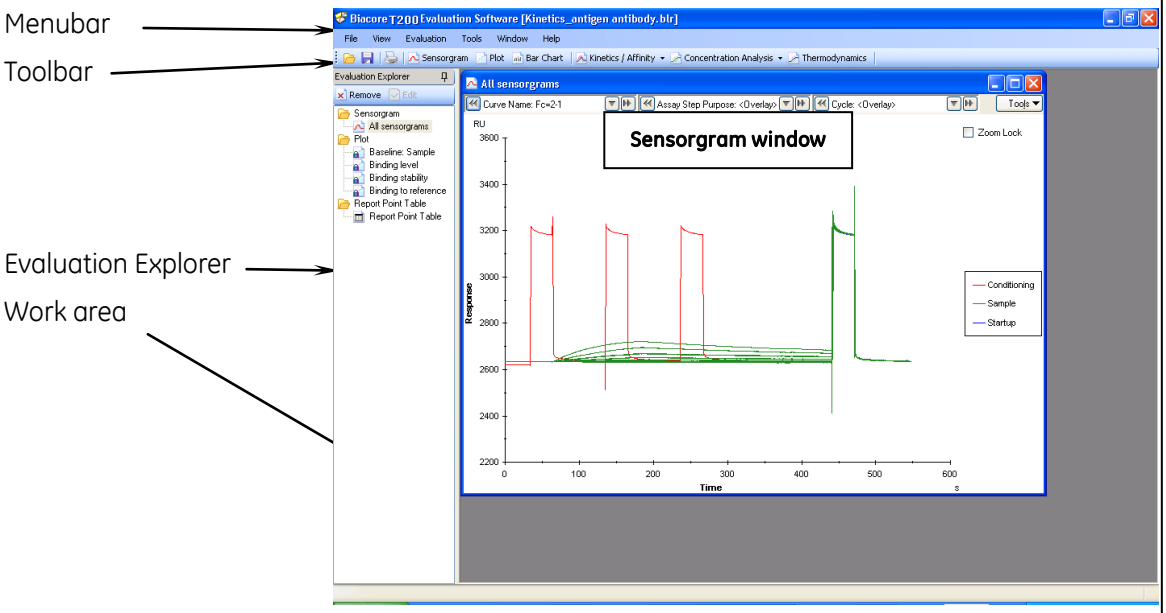
9-2. ファイルの呼び出し

アイコン（ ）もしくは **File** → **Open...**をクリックし、目的のファイルを選択します。（通常、ファイルは、C:/BIA users/に保存されています。）
ここでは、練習用データ C:/BIA users/T200 demo File / Binding Analysis を選択します。
OK をクリックします。

↓



補足 9-1. 画面の説明



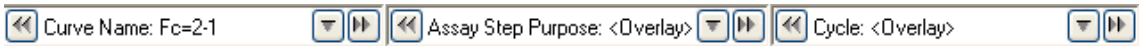
Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

9-3. センサーグラムの編集

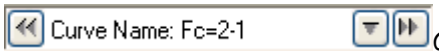
Evaluation Explorer で Sensorgram フォルダから、All sensorgrams をクリックし、Work area 内に Sensorgram window を表示します。

9-3-1. センサーグラムの表示

Sensorgram window 上部のセレクションツールを使用します。

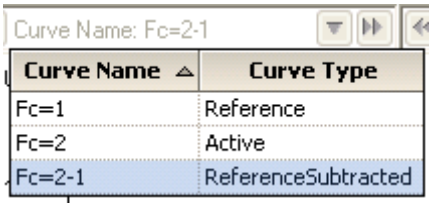


フローセル別センサーグラムの選択

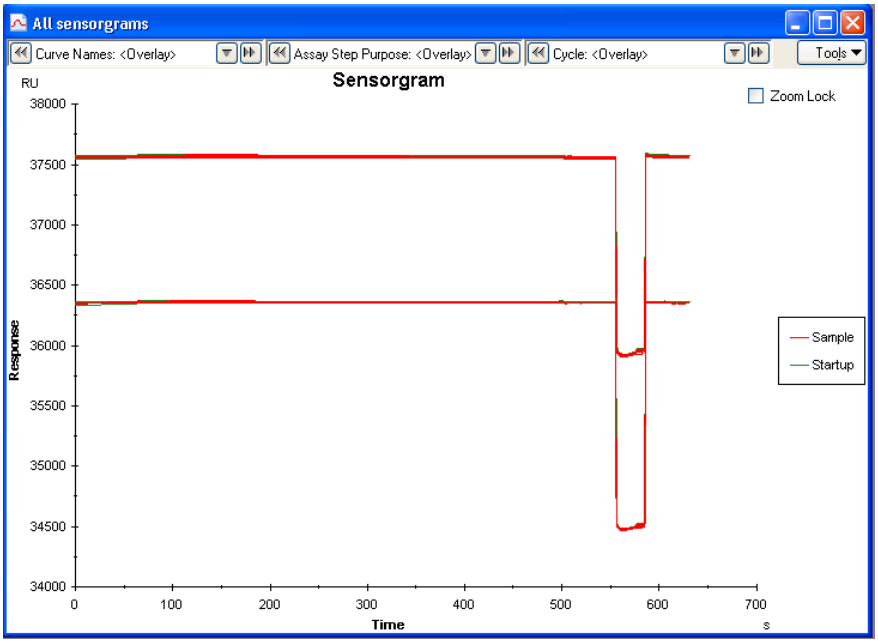


の もしくは をクリックし、目的のフローセルを選択します。

複数のフローセルを同時に選択する場合は、 を使用します。



キーボードの Ctrl キーを押しながら、目的のフローセルをクリックします。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても選択可能です。



特定のセンサーグラムの選択

Cycle: <Overlay>　　の もしくは をクリックし、目的のサイクルを選択します。

↓

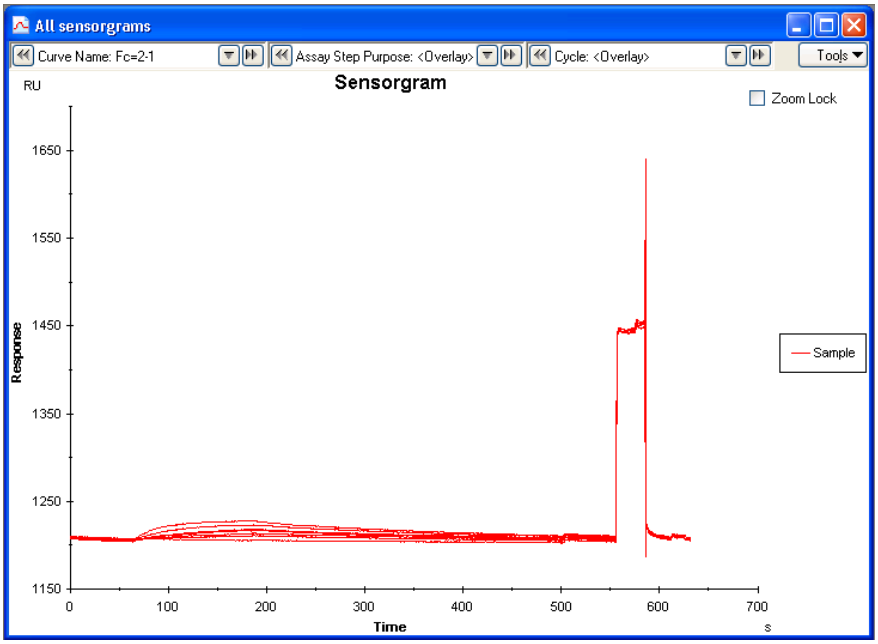
複数のサイクルを同時に選択する場合は、 を使用します。

Assay Step Purpose: <Overlay>　Cycle: <Overlay>

Included	Cycle#	Assay Step Purpose	Sample Name	Conc.	MW
Yes	1	Startup	Buffer		
Yes	2	Startup	Buffer		
Yes	3	Startup	Buffer		
Yes	9	Sample	Beta2micro	32	11800
Yes	8	Sample	Beta2micro	16	11800
Yes	7	Sample	Beta2micro	8	11800

キーボードの **Ctrl** キーを押しながら、目的のサイクルをクリックします。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても選択可能です。

↓



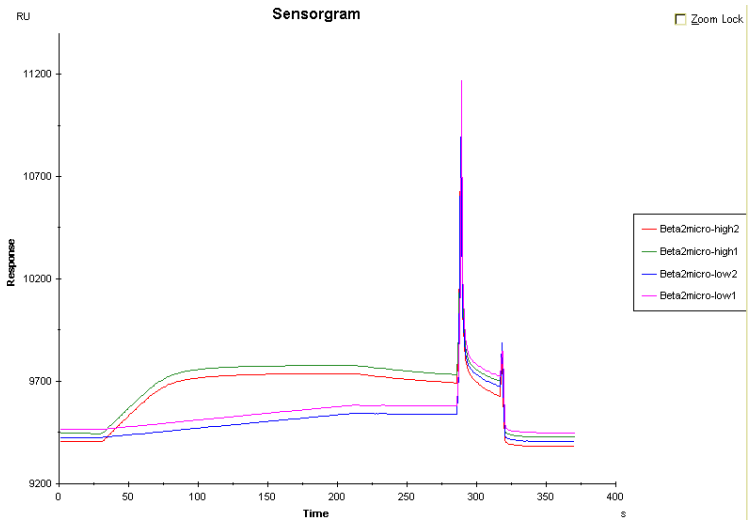
9-3-2. センサーグラムの表示の変更

Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある Tools を使用します。

色の表示の変更

Tools → Color By → Sample をクリックします。

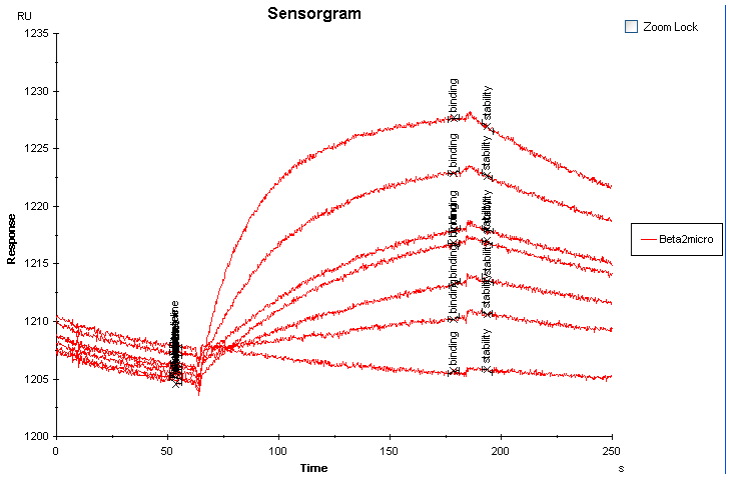
サンプル名ごとに、自動的にセンサーグラムの色が変更します。



その他、測定温度ごとやフローセルごとにも色を変更することができます。

レポートポイントの表示

Tools → Report Point → Id and Marker をクリックします。

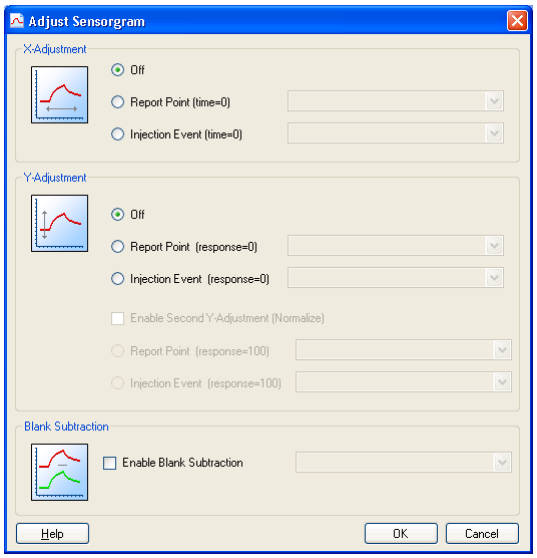


レポートポイントの id が表示されます。

9-3-3. センサーグラムの添加開始時間、ベースライン合わせ

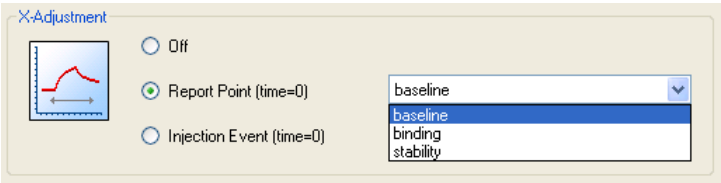
Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある Tools を使用します。

Tools → Sensorgram Adjustment...をクリックします。

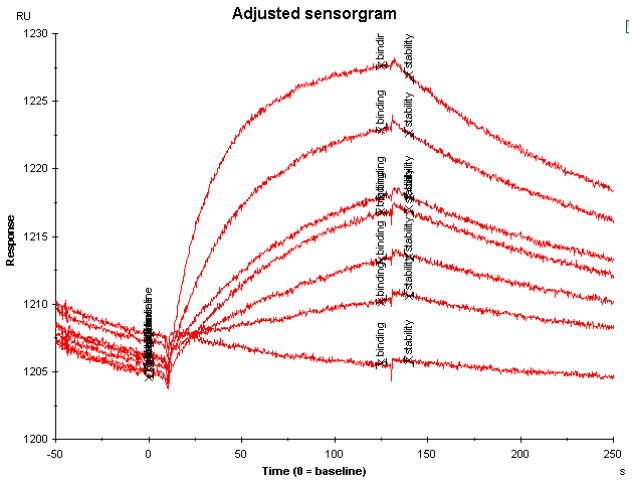


サンプル添加開始時間合わせ

X-Adjustment v に Report point （time=0）をクリックし、 で baseline を選択します。

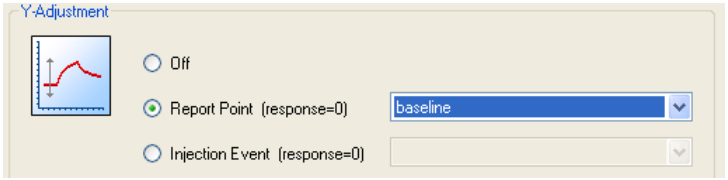


OK をクリックします。

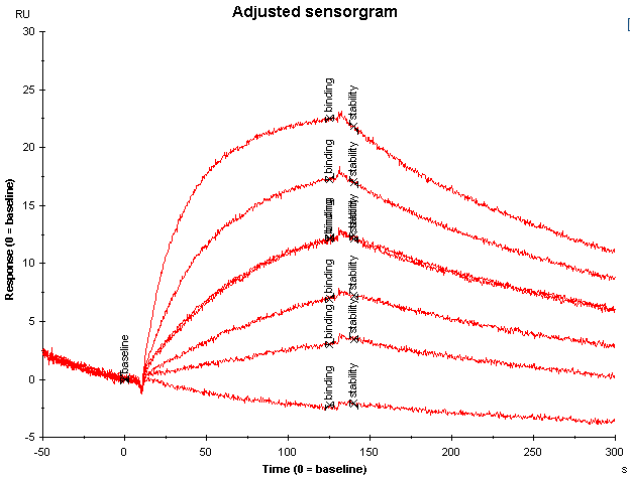


ベースラインあわせ

Y-Adjustment も同様に、**Report point** （**response=0**）をクリックし、▼で **baseline** を選択します。

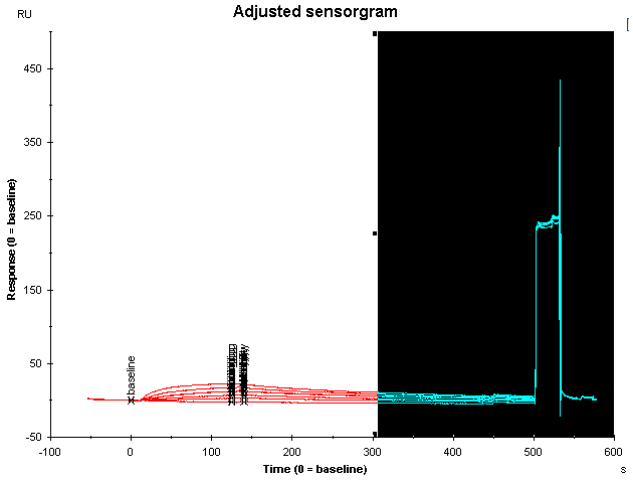


OK をクリックします。

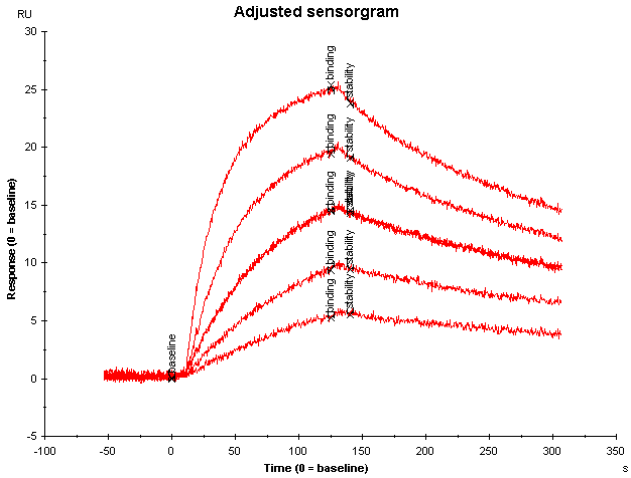


9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除

削除する範囲を、マウスを右クリックしたままドラッグして選択します。



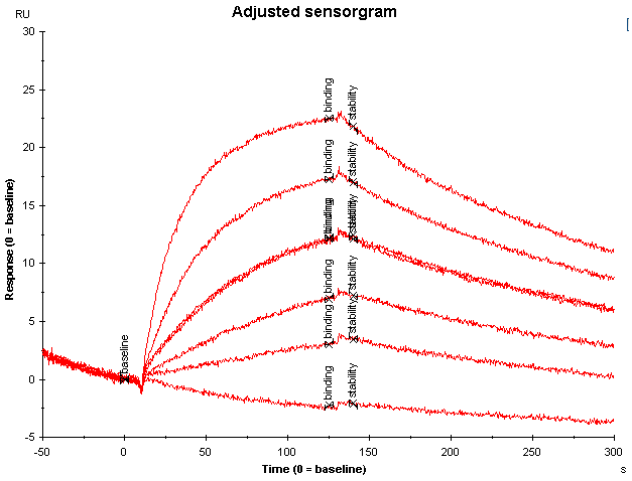
余白部分で右クリックし、Cut を選択します。



選択した範囲が削除されます。

9-3-5. センサーグラムの差し引き

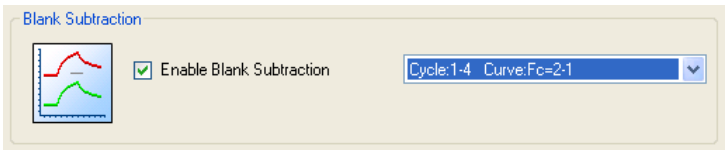
差し引きしたいセンサーグラム（ブランク）と、差し引くセンサーグラムを重ね書きします。ブランクのセンサーグラムの上にポインターを移動して表示されるサイクル数を確認します。



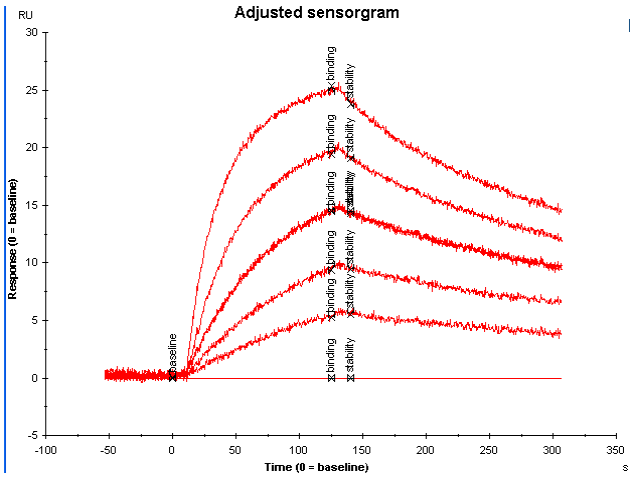
Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある

を使用します。

Tools → Sensorgram Adjustment...をクリックします。



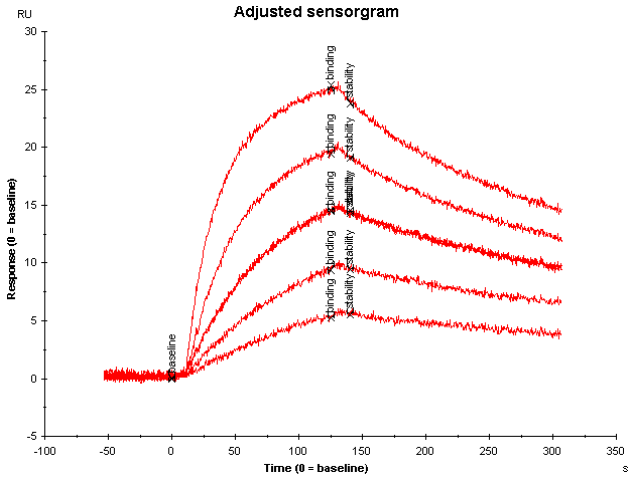
Blank Subtraction の **Enable Blank Subtraction** にチェックを入れ、をクリックしてブランクのセンサーグラムを選択します。



ブランクのセンサーグラムは直線に変わります。

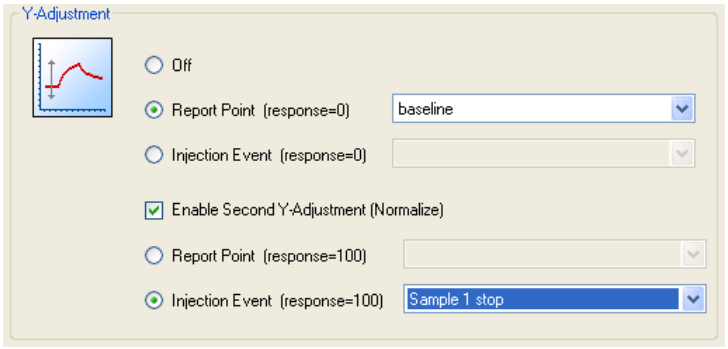
9-3-6. センサーグラムのノーマライズ

指定した結合量を基準として、結合量の 100 あわせを行うことをノーマライズといいます。
解離速度の比較を行う場合などに使用します。
添加開始およびベースラインのゼロ合わせを実施したセンサーグラムを用いて実施します。

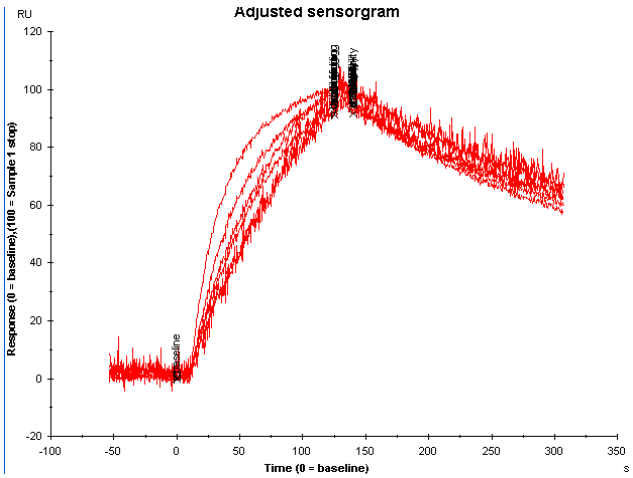


Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある Tools を使用します。

Tools → **Sensorgram Adjustment...**をクリックします。



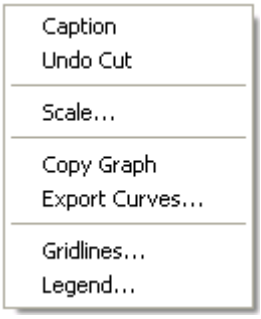
Enable Second Y-Adjustment （Normalize）にチェックを入れます。解離速度定数の比較を行う場合には、**Injection Event （response = 100）**を選択して、をクリックして添加終了（Sample 1 stop）を選択します。**OK** をクリックします。



添加終了時点の結合量を 100 RU として、ノーマライズ後のセンサーグラムが表示されます。

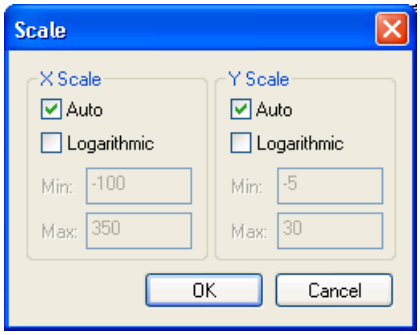
9-4. グラフの編集

Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用します。



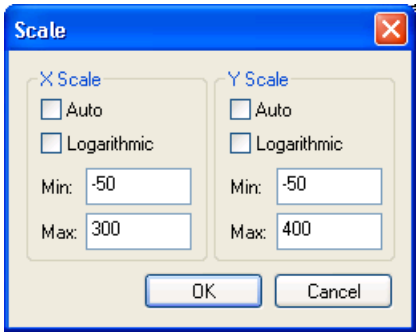
スケールの変更

Scale...



通常 **Auto** が選択されています。スケールを変更する場合は、

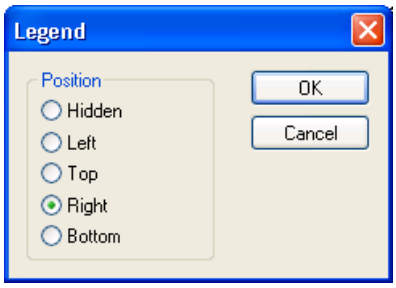
のチェックを外し、各軸のスケールの最小値（Min:）と最大値（Max:）を入力します。



OK をクリックします。

凡例の移動と削除

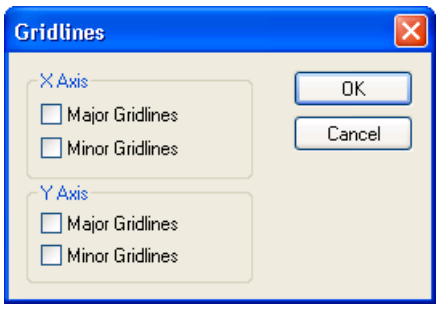
Legend…



通常 **Right** が選択されています。移動する位置を選択します。凡例をグラフに表示しない場合は、**Hidden** を選択します。**OK** をクリックします。

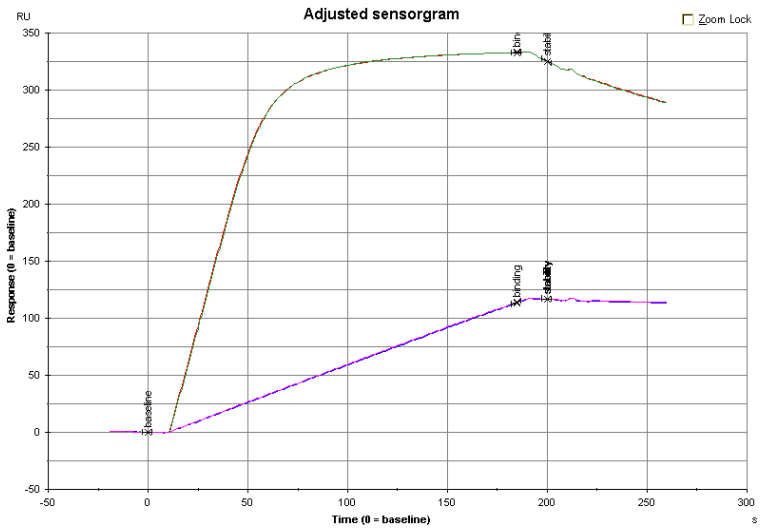
グリッドラインの表示

Gridlines…



主軸目盛りに対してグリッドラインを表示させるときは、Major Gridlines にチェックを入れます。副目盛りに対してグリッドラインを表示させるときは、Minor Gridlines にチェックを入れます。

OK をクリックします。

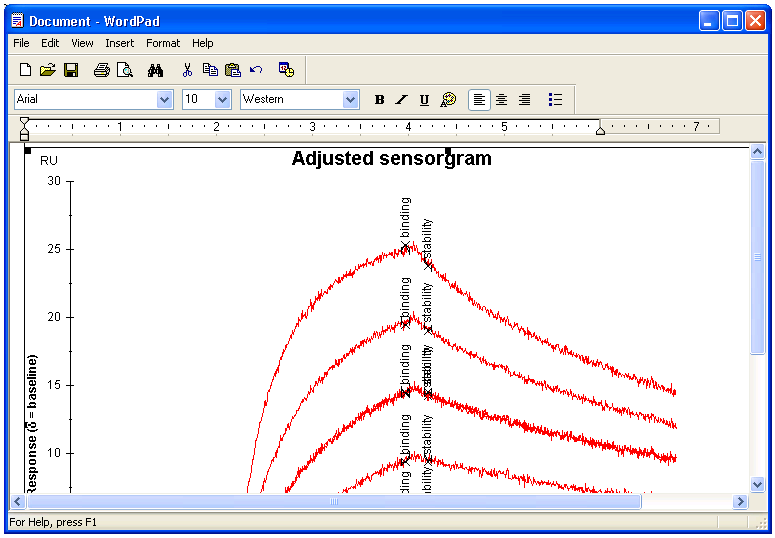


9-5. データの移管

データの移管方法には、次の方法があります。
①画像データファイルとして移管
②テキスト形式ファイルとして移管
③エクセル形式ファイルとして移管

画像データファイルして移管

Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用します。
Copy Graph をクリックします。
グラフを画像としてコピーします。続いて Biacore 付属のパソコンにインストールされている Word Pad、Paint などに貼り付け、貼り付けたファイルを保存します。保存したファイルは、画像として別のパソコンに移動させることが可能です。
（例）Word Pad への貼り付け



センサーグラムをテキスト形式ファイルとして移管

Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用します。
Export Curves...をクリックします。

↓

保存先を指定して保存します（拡張子：txt）。保存したファイルは、他のパソコンの Excel などのグラフ描画機能を持つソフトウェアで再びセンサーグラムを作成することが可能です。

（例）保存した text ファイル

Beta2micro-high2_X	Beta2micro-high2_Y	RPoint_X	RPoint_Y	Beta2micro-hi
-19 0.558594	-3 0.0712891	-19 0.833984	-3	0.0576172
-18 0.533203	0 0	-18 0.761719	0 0	-18 0.745
-17 0.5625 2	-0.0820313	-17 0.779297	2 -0.102539	-17
-16 0.457031	182 332.89	-16 0.740234	182 332.645	-16 0.609
-15 0.417969	185 333.021	-15 0.712891	185 332.791	-15 0.538
-14 0.411133	187 332.999	-14 0.701172	187 332.898	-14 0.501
-13 0.400391	197 327.708	-13 0.618164	197 327.761	-13 0.421
-12 0.310547	200 325.22	-12 0.567383	200 325.211	-12 0.359
-11 0.216797	202 323.455	-11 0.496094	202 323.496	-11 0.459
-10 0.198242		-10 0.349609		-10 0.431
-9 0.182617		-9 0.414063		-9 0.332
-8 0.25293	-8 0.391602		-8	0.436523
-7 0.181641		-7 0.267578		-7 0.291
-6 0.143555		-6 0.24707	-6	0.204102
-5 0.0888672		-5 0.15332	-5	0.126953
-4 0.178711		-4 0.170898		-4 0.122
-3 0.0712891		-3 0.0576172		-3 0.095
-2 0.0488281		-2 0.0605469		-2 -0.03
-1 0.0195313		-1 0	-1	-0.0488281
0 0	0 0		0 0	
1 -0.0283203		1 -0.0517578		1 -0.11
2 -0.0820313		2 -0.102539		2 -0.15
3 -0.169922		3 -0.194336		3 -0.13
4 -0.130859		4 -0.303711		4 -0.15

解析データを Excel 形式ファイルとして移管

File → Export → Result To Excel...をクリックします。

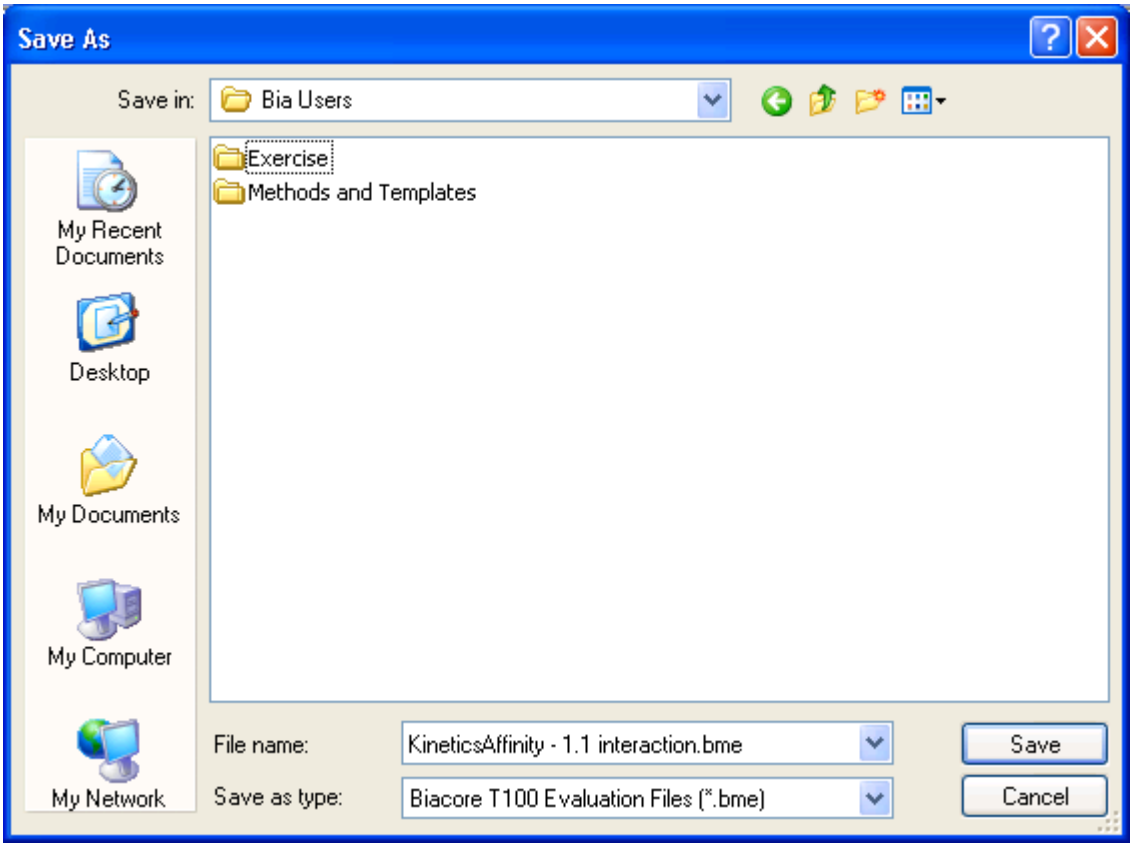
保存先を指定して保存します（拡張子：xls）。Evaluation Explorer に表示されている解析結果の数値データなどが保存されます。ただし、センサーグラムのデータは保存されません。他のパソコンの Excel で解析結果を開くことができます。

（例）保存した xls ファイル

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Evaluation	Kinetics / Affinity									
2	Name:	Beta2micro									
3											
4	Sample:	Beta2micro									
5	Temperatu	25									
6	Curve:	Fc=2-1									
7											
8	Model:	1:1 Binding									
9	Description:										
10											
11	Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/m	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU)
12		1147601	0.002635	2.3E-09	24.50454		1.17E+09				0.136664
13	Cycle: 5	2 nM				2E-09		30	3.63E+09	0.178485	
14	Cycle: 6	4 nM				4E-09		30	3.63E+09	0.31193	
15	Cycle: 7	8 nM				8E-09		30	3.63E+09	0.113137	
16	Cycle: 8	16 nM				1.6E-08		30	3.63E+09	0.242235	
17	Cycle: 9	32 nM				3.2E-08		30	3.63E+09	0.992655	
18	Cycle: 10	8 nM				8E-09		30	3.63E+09	0.212286	

9-6. データの保存

File → **Save As…**をクリックします。



Save in:に保存先（C:/Bia Users/個人名など）を選択し、**File name:**にファイル名を入力し、**Save** をクリックします。

補足 9-2. ファイルのアイコン

ファイルの種類によってアイコンが異なります。

Biacore T200 Control ソフトウェアで保存したファイル

Biacore T200 Evaluation ソフトウェアで保存したファイル

テキスト形式で保存したデータファイル

索 引

A

Add Report point 21

After run 95, 129

Aim for immobilized level 35, 42

Analysis temperature 10, 29, 37, 61, 103, 129

Application wizards 14

Assay step preparations 131, 142

Assay Steps 95, 124, 127

Automatic Positioning 63, 105, 149

B

Base Line 51

Baseline 21, 67, 110, 171

Batch mode 68, 81, 88

Biacore Maintenance Kit 152, 154, 155, 160, 162, 163

Binding Analysis 53

Binding level 67, 110, 171

Binding to reference 67, 110, 171

Bivalent Analyte 72, 115

Blank immobilization 35

Buffer settings 95, 129

Bulk Effect 45

C

Capture 58, 136, 137

Carry Over 58

Chi^2 ..... 75, 76, 91, 118, 119

Concentration 53, 60, 139

Concentration Analysis 53

Concentration unit 95, 129

Concentrations per cycle 98

Connect to cycle type 131

Contact time 29, 49, 59, 98, 99, 136

Copy Graph 182

crude 45

Current Fits 78, 80, 121, 123

Custom Methods 35
Cycle Run List 61, 133, 134
Cycle Types 97, 127
D
Data Collection rate 95, 128
Desorb 154
Desorb and Sanitize 155, 163
Detection 58, 95, 128, 137
Dissociation time 59, 98, 99, 136
DMSO 3, 26, 46, 128
Dock Chip 6, 153
E
EDC 25, 36, 38, 40
Eject Rack 11, 30, 38, 49, 64, 106, 148
Eject Rack Tray 11, 30, 38, 64, 106, 148
Empty Buffer Tubing 158, 164
End manual run 22, 51
End Run 22, 51
Enhancement 137
Evaluation Variables 139
Export Curves 182
Extra wash after injection with 98, 137
F
Flow path 15, 28, 47, 58, 98, 99, 101, 136, 144
Flow rate 15, 29, 47, 59, 98, 99, 136
Fraction 137
G
General 138
General Settings 94, 126
H
Heterogeneous Analyte 72, 115
Heterogeneous Ligand 72, 115
High performance 136
High viscosity solution 59, 138
I
If…Then 138

Immobilization pH Scouting 26, 27, 28, 32, 33
Immobilization Results 43
Immunogenicity 53
Inject command 18, 19, 48, 49
InjectAndRecover 138
K
k_a 54, 55, 73, 75, 77, 85, 93, 116, 118, 120
k_d 54, 55, 73, 75, 77, 85, 93, 116, 118, 120
K_D 45, 54, 55, 56, 75, 91, 92, 93, 118
Keyword Table 66, 87, 109
Kinetics Summary 85
Kinetics/Affinity 53, 57, 139
L
Low Sample consumption 99, 136
M
Manual run 14, 15
Method Variables 139
Methods 14
Methods and Templates 28, 31, 34, 38, 41, 57, 64, 106, 125, 148
Mix with 137
Multiple Rmax 83
N
New chip 5
NHS 23, 25, 26, 33, 35, 36, 38, 40, 44
Normalize 29, 37, 61, 103, 147, 162, 179
Number of cycles 59
Number of replicates 96, 97, 131, 134, 142
O
On-Off Rate Map 86
Overview 94, 126
P
Predip 137
Prime 9, 29, 37, 61, 103, 147, 153, 154, 157, 163
Print 22
Purpose 130, 131

Q

Quality Assessment 92

Quality Control 73, 116

R

Rack tray 12, 13, 30, 38, 64, 106, 148

Reagent rack, Type 1 12

Reagent rack, Type 2 12

Recurrence 131, 132, 134, 142

Reference line 20

Reference Line 20, 51

Regeneration 50, 58, 98, 99, 136, 138

Regeneration Scouting 52

Remove Selection 70, 113

Repeat assay step within 132

Report 21, 75, 118

Report point 21, 175, 176

Req 55, 90

Residuals 74, 76, 117, 119

Response Bound 40

Response Final 40

Result To Excel 183

Reuse chip 5, 7

RI 73, 75, 76, 77, 79, 116, 118, 119, 120, 122

R_{max} 24, 55, 73, 75, 77, 79, 91, 116, 118, 120, 122

Run 4, 15

S

Sample and reagent rack 12

Sample compartment temperature 29, 37, 61, 95, 103, 128

Sample solution 136

SE 76, 119

Sensor Chip Maintenance 151, 152, 153

Sensorgram Adjustment 175, 177, 178

Show All Curves 48

Show average blank(s) 68, 88, 111

Show Curves of Same Type 48

Show Only Current Curve 48

Single cycle kinetics 98, 136
Single mode 68, 88
Single-cycle Kinetics 94
Solvent correction 138
Specify contact time and flow rate 35
Stabilization period 59, 98, 137
Standard error 76, 119
Standby flow 6, 9, 22, 32, 39, 51, 65, 107, 148, 153, 154, 157, 162, 166
Startup 58, 96, 99, 102
Steady State Affinity 90
Stop Run 65, 108, 150
Surface Performance 52
Surface Preparation 28, 34, 41
System Check 163
T
Target level 42
Temperature 4, 10, 29, 37, 61, 103
Thermodynamics 53, 139
Tile Horizontally 82
Tile Vertically 82
Two state Reaction 72, 115
Type 99
Types 136
U
U-value 75, 76, 118, 119
V
Variable Settings 99, 127, 143
Verification 100, 126, 143
Verifivcation 127
Vial/well position 49
W
Wash Buffer Tubing 160
Wash solution 42

あ
アイコンの説明 17
アナライトの回収 53, 138
アフィニティー 54
アフィニティーが 56
アミンカップリングキット 25
アミンカップリング法 23
アルデヒドカップリング法 23
い
一時停止 17
印刷 22
え
エクセル形式ファイル 182
エタノールアミン 25
か
カーブフィッティング 55
カイネティクス解析 54
解離速度定数 54
解離定数 24, 45, 53, 54
化学耐性 26
画像データファイル 182
き
キャリーオーバー 58, 138
緊急停止 39
結合速度定数 54
こ
固定化 23
固定化量 24
さ
サーフェスチオールカップリング法 23
再解析 77, 78, 79, 120, 121, 122
サイクルの切り替え 17
再生条件 45, 46, 52, 59
再生溶液 46, 50
最大結合量 24
残差プロット 74, 76, 117, 119

サンプル位置 62, 63, 104, 105, 147, 149
サンプル情報 61, 66, 87, 109
し
シグナルの校正 162
システムチェック 163
至適アナライト濃度 93
自動判断機能コマンド 138
試料必要量 15
シングルサイクル法 45, 53, 54, 136
す
スクリーニング 24
スタンバイ 166
ステータスマーク 73, 116
せ
センサーグラムの編集 169, 172
センサーチップの固定化履歴 7
センサーチップの挿入 5
センサーチップの保存 167
そ
測定の終了 17, 22
た
ダミーラン 58, 99
て
データの移管 182
テキスト形式ファイル 182
電源の落とし方 166
の
濃度測定 24
ノーマライズ 178
は
バイアル 12
バッチ解析 68
反応速度定数 45
反応モデル 71, 72, 114
ひ
非線形最小二乗法 55

標準誤差 76, 119
ふ
ファイルのアイコン 184
フィッティング 117
プーリング機能 63, 105, 149
プレコンセントレーション効果 27
へ
平衡値解析 87
ま
マストランスポートリミテーション 24, 73, 116
マニュアル測定 15
マルチサイクル法 53, 54
め
メソッド 143
メソッドビルダー 14, 124, 126
メンテナンス 151, 153
ゆ
有機溶媒 26, 46
よ
溶液効果 45, 73, 75, 91, 116, 118
溶媒補正 132, 134, 138, 141
ら
ラックトレイ 11, 12, 13
ラックの取り出し 17
ランニング緩衝液の交換 9
ランニング緩衝液の種類 3
り
リガンド希釈液 25, 26, 27, 28
リガンドチオールカップリング法 23
リファレンスセル 35, 45
リファレンスライン 20, 21, 50, 51
リファレンスラインウィンドウ 51
流速の変更 17
流路の切り替え 17
れ
レポートポイント 20, 22, 50, 67, 110, 138, 140

レポートポイントテーブル 20
レポートポイントの追加 20

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁 止 ⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁 止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁 止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁 止

電源コード・電源プラグを傷つけない

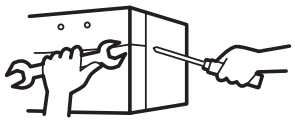
●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁 止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

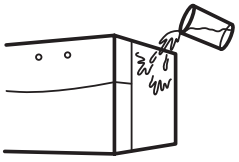
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁 止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁 止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁 止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

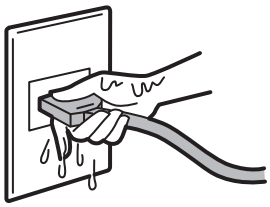
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

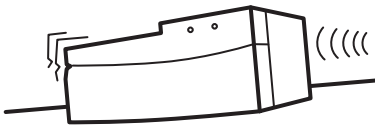
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

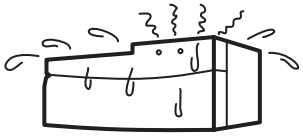
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

■テクニカルの質問

● FAQ (製品 Q&A) の検索

弊社トップページ www.gelifesciences.co.jp より、サポート> FAQ (製品 Q&A) をクリック

● TEL：03-5331-9336

応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。

クロマトグラフィー関連製品 ：❶
ビアコア・MicroCal 関連製品 ：❷
電気泳動関連製品 ：❸
その他製品 ：❹

● FAX：03-5331-9370

● e-mail：Tech-JP@ge.com

注）主な製品マニュアルや製品 Q&A は弊社 Web サイトで公開していますのであわせてご活用ください。

■機器アフターサービス

TEL：03-5331-9315　FAX：03-5331-9349

■納期／在庫お問合せ

TEL：03-5331-9330　FAX：03-5331-9324

注）お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。
注）アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。

www.gelifesciences.co.jp

e-mail で最新情報をお届けしています。お申込みは上記 Web サイト左下の「メールマガジン購読」から。

©2013 GEヘルスケア・ジャパン株式会社　本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめ ご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。
お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

Intertek
ISO 9001:2008
認証取得

取扱店